

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-267118

(P2004-267118A)

(43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 126 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-63578 (P2003-63578)

(22) 出願日 平成15年3月10日 (2003.3.10)

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(74) 代理人 100081400

弁理士 大野 彰夫

(74) 代理人 100092716

弁理士 中田 ▲やす▼雄

(74) 代理人 100115750

弁理士 矢口 敏昭

(74) 代理人 100119622

弁理士 金原 玲子

(72) 発明者 福地 圭介

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共

株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌遺伝子及びその用途

(57) 【要約】

【課題】前立腺癌細胞の発生及び/または増殖に関連する遺伝子を見出し、該癌遺伝子を用いた前立腺癌の検出方法、前立腺癌治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法、及び前立腺癌治療及び/または予防用医薬組成物を提供すること。

【解決手段】 T M P M 4、 P L A 1 A 及び/または B U C S 1 の発現量を指標とした前立腺癌の検出方法、該検出方法に用いる前立腺癌検出用キット、新規前立腺癌治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法並びに前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物の提供。

【選択図】なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の工程 1) 乃至 4) を含む、前立腺癌の検出方法：

- 1) 被験者より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；
- 2) 正常人より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程 1) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2) 由来の全 R N A 画分における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

1 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、

2 配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

3 配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

- 4) 上記工程 1) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2) 由来の全 R N A 画分との間における上記工程 3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程 1) に記載の被験者の前立腺癌を検出する工程。

10

【請求項 2】

下記の工程 1) 乃至 3) を含む、前立腺癌の検出方法：

- 1) 被験者より採取した検体における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程；

1 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、

2 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

3 配列表の配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

- 2) 正常人から採取した検体における、上記工程 1) の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質の発現量を測定する工程；

- 3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と上記工程 2) で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者または被験動物の前立腺癌を検出する工程。

20

30

【請求項 3】

下記の工程 1) 乃至 4) を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

- 1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全 R N A 画分を抽出する工程；

- 2) 被験物質を添加しないで培養した哺乳動物由来培養細胞より、全 R N A 画分を抽出する工程；

- 3) 上記工程 1) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2) 由来の全 R N A 画分における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

1 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、

2 配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

3 配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

- 4) 上記工程 1) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2) 由来の全 R N A 画分との間における上記工程 3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

40

【請求項 4】

50

下記の工程 1) 乃至 4) を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

1) 被験物質を投与した哺乳動物個体より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程；

2) 被験物質を投与しなかった哺乳動物個体より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程；

3) 上記工程 1) 由来の全 RNA 画分と上記工程 2) 由来の全 RNA 画分における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

1) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、

2) 配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

3) 配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

4) 上記工程 1) 由来の全 RNA 画分と上記工程 2) 由来の全 RNA 画分との間における上記工程 3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【請求項 5】

下記の工程 1) 乃至 3) を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程；

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、

2) 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

3) 配列表の配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

2) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、上記工程 1) の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；

3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と、上記工程 2) で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【請求項 6】

下記の工程 1) 乃至 3) を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：

1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程；

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、

2) 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

3) 配列表の配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

2) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した検体における、上記工程 1) の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程；

3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と、上記工程 2) で検出された該蛋白質の

発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【請求項7】

トランジエント・レセプター・ポテンシャル・カチオン・チャンネル、サブファミリーM、メンバー4 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4: 以下、「TRPM4」とする。)の陽イオン透過チャンネルを阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程1)乃至3)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

- 1) TRPM4を細胞表面に発現している細胞を供給する工程;
- 2) Ca^{2+} の存在下において1)に記載の細胞と被験物質を接触する工程;
- 3) 細胞内への陽イオンの取り込みが減少するかどうかを決定する工程(ここで、細胞内への陽イオンの取り込みが減少することは被験物質がTRPM4の陽イオン透過チャンネルを阻害していることを示す。)

10

【請求項8】

フォスホリパーゼA1活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程1)及び2)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

- 1) フォスホリパーゼA1メンバーAの基質とフォスホリパーゼA1メンバーAを被験物質と接触する工程;
- 2) 被験物質の存在下で基質を加水分解する活性が減少するかどうかを決定する工程(ここで、基質を加水分解する活性が減少することは被験物質がフォスホリパーゼA1活性を阻害することを示す。)

20

【請求項9】

ブチリル・コエンザイムA・シンターゼ1 (butyryl Coenzyme A synthetase 1: 以下、「BUCS1」という。)のアシル-CoAの合成活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程1)乃至2)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

- 1) BUCS1の基質とBUCS1を被験物質と接触する工程;
- 2) 被験物質の存在下でアシル-CoAの合成量が減少するかどうかを決定する工程(ここで、アシル-CoAの合成量が減少することは被験物質がBUCS1のアシル-CoAの合成活性を阻害することを示す。)

30

【請求項10】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはランオン・アッセイであることを特徴とする、請求項1、3及び4のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が動物組織または動物細胞由来の相補的DNA群または該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップまたはアレイを用いることを特徴とする請求項1、3及び4のいずれか一つに記載の方法。

40

【請求項12】

蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いることを特徴とする、請求項2、5及び6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】

蛋白質の発現量の測定方法が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法または固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、請求項2、5及び6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】

下記の1)乃至3)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果判定用キット:

50

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

【請求項15】

下記の1)及び2)の少なくとも一つを含む、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果判定用キット：

1) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；

2) 上記1)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

【請求項16】

下記の1)乃至3)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む、前立腺癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

下記の 1) 及び 2) の少なくとも一つを含む、前立腺癌の検出用キット：

- 1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；
- 2) 上記 1) に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

【請求項 18】

下記の 1) 乃至 5) からなる群から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列または該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含む前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物：

- 1) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列；
- 2) 配列表の配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列；
- 3) 配列表の配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列；
- 4) 配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列；
- 5) 配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列。

【請求項 19】

配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質を特異的に認識する抗体を含有する前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、前立腺癌で顕著に発現量が高い遺伝子を用いた前立腺癌の検出方法、前立腺癌の治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法、及び前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物等に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌は、欧米や日本などの先進諸国において、依然として主たる死亡原因の一つである。臨床的には、外科的癌組織の切除、放射線治療及び化学療法を含む種々の医学的方法がとられてきているが、悪性形質転換及び癌細胞の増殖に関する十分正確な理解に基づくものとは言えず、多くの場合、その効果は部分的で多くの患者を満足させるものではない。そのような悪性形質転換及び癌細胞の増殖機構に関し、過去 10 数年に渡り多くの研究施設において精力的な研究が進められてきた。現在では、正常細胞の増殖は、癌遺伝子 (Oncogene) (増殖促進遺伝子) と癌抑制遺伝子 (Tumor suppressor gene) (増殖阻害遺伝子) 等様々な遺伝子の質的および量的な変化によって制御されていると考えられている (例えば、非特許文献 1 参照。)

【0003】

細胞内在性の癌遺伝子は、一般的にそれ自体は正常細胞を癌化させる効果は必ずしも強いものではないが、構造変異によりその調節機能が失われると、癌遺伝子となり異常増殖、癌化の直接的な原因となる。例えば、点突然変異で癌を引き起こす Ras や、染色体転座により酵素活性の異常亢進を引き起こす Abl 遺伝子などがその一例である。また、変異を生じなくとも、癌遺伝子の発現亢進が、癌化の引き金となる場合も多い。増殖因子受容体 HER2/neu の遺伝子増幅などによる発現亢進が転移性乳癌で惹起され、その阻害剤が転移性乳癌の治療に用いられているのはその一例である。以上のような事実は、これら癌遺伝子が、癌治療の標的として、極めて妥当な標的分子を提供するという作業仮説を強く示唆している。

10

20

30

40

50

【0004】

癌疾患の中でも前立腺癌は、特に米国で最も頻繁に診断される癌であり、かつ男性の癌死原因の第二番目である。年間およそ300,000人の男性が新規に前立腺癌と診断され、また40,000人以上の男性が本疾患で死亡している。前立腺癌による死亡は主に転移した疾患に起因しているにも関わらず、新しく診断された患者の60%近くは前立腺に限局した一次腫瘍を有している。こうした限局癌の患者に対しては外科手術及び放射線治療がしばしば有効であるが、転移伝播した癌患者の場合は、ほとんどの場合治療不能である。現在まで精力的な研究が進められてきているものの、前立腺癌の発生及び進行を引き起こす生物学的な機構に関してはごく僅かしか知られていない。

【0005】

これら（前立腺癌をはじめとする）癌の発生、進行に関連する遺伝子の発見は、その機構の解明及び治療薬開発の上で極めて有用である。特にその分子機能を阻害することによって、癌細胞の増殖抑制や細胞死を誘導しうるものは、新たな癌治療の標的分子として期待できる。

【0006】

標的分子の機能阻害による効果を知る代替法として、何らかの方法により、その遺伝子の発現を低下させる手法が用いられる。標的遺伝子と相補的な配列を持つ一本鎖DNAであるアンチセンスオリゴヌクレオチドやRNA切断活性を持たせた一本鎖RNAであるリボザイムを用いた方法などがその例である。これらに加え、最近二本鎖RNA(dsRNA)を用いたRNA interference(RNAi)が利用できるようになって来た（例えば、非特許文献2参照。）。

【0007】

RNA interference(RNAi)は、dsRNAにより、細胞内に存在する相同なmRNAが特異的に分解される現象で1998年に初めて線虫で起こる現象として報告された（例えば、非特許文献3参照。）。哺乳動物では長鎖のdsRNAがインターフェロン応答を引き起こしてしまうため（例えば、非特許文献4及び5参照。）、当初はRNAi効果の特異的な遺伝子抑制手法として利用するのは困難であると考えられていたが、2001年にElbashirらによってRNAiの中間産物である21-23merの短いdsRNA(siRNA)を利用することによってインターフェロン応答を回避しつつRNAi効果を誘導できることが報告され（例えば、非特許文献6参照。）、このsiRNAによるRNAiは、これまでに無い簡便且つ強力な遺伝子発現抑制手法として注目を集めている。

【0008】

Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4（以下、「TRPM4」とする）は、Xuらにより心臓、前立腺、大腸に発現するチャネル様分子として最初にクローニングされ、単鎖型(TRPM4a)と長鎖型(TRPM4b)が存在することが報告されている（例えば、非特許文献7参照。）。また、Laubaryらにより、TRPM4bがカルシウムではなく、ナトリウムやカリウムイオンを透過させること、そしてカルシウムイオンの動員による刺激でチャネルが開くことが報告されている（例えば、非特許文献8参照。）。TRPM4はTRP9とも呼ばれており、前立腺で発現していることが示されているが、正常な前立腺と前立腺癌との間で発現量には差がないと報告されており（例えば、特許文献1参照。）、その機能と癌との関連性については全く明らかになっていない。

【0009】

Homo sapiens phospholipase A1 member A（以下、「PLA1A」とする。）は、ラット血小板のトロンピン刺激培養上清からSatohらにより精製・同定された蛋白であり、ホスファチジルセリンやリゾフォスファチジルセリンなどのセリンリン脂質に特異的に作用し、脂肪酸を切り離すリパーゼとして働くことが知られる（例えば、非特許文献9参照。）。そのヒトオーソログ遺伝子は、Naga

10

20

30

40

50

iらによってヒト肝よりクローニングされた(例えば、非特許文献10参照。)。ラットでは、血小板に豊富に発現しているものの、ヒト血小板にはほとんど存在しておらず、様々な臓器で発現が認められる。

【0010】

ホスファチジルセリンは、細胞内では、プロテインキナーゼC(例えば、非特許文献11参照。)、c-r a f - 1(例えば、非特許文献12参照。)、一酸化窒素合成酵素(例えば、非特許文献13参照。)、Na⁺/K⁺-ATP分解酵素(例えば、非特許文献14参照。)、GTP分解酵素(例えば、非特許文献15参照。)、ジアシルグリセロールキナーゼ(例えば、非特許文献16参照。)等を制御することが知られている。一方、細胞外では、血液凝固反応(例えば、非特許文献17参照。)やマクロファージの貪食能(例えば、非特許文献18参照。)を活性化することが知られており、その分解酵素であるPLA1Aは、それらホスファチジルセリンの作用に対し抑制的に働くことが予想されている(例えば、非特許文献19参照。)。リゾフォスファチジルセリンについては、ヒト卵巣癌株や乳癌株の細胞内カルシウム濃度を一過性に上昇させ(例えば、非特許文献20参照。)、また、リンパ腫細胞株Jurkat T細胞にも細胞内カルシウム濃度を上昇させるとの報告がある(例えば、非特許文献21参照。)。また、ケラチノサイトでは、その細胞増殖を亢進させることも報告されている(例えば、非特許文献22参照。)。癌との関連については、Van Groningenらが、転移性とその発現が逆相関する遺伝子として単離した遺伝子nmd1(例えば、非特許文献23参照。)と同一であったことが挙げられるが、これらを除いては、癌細胞との関連指摘した報告はなく、その機能と癌特に前立腺癌との関連性については明らかになっていない(例えば、特許文献2参照。)

【0011】

Homo sapiens butyryl Coenzyme A synthetase 1(以下、「BUCS1」という。)は、Fijinoらにより、炭素鎖が4から16の脂肪酸のうち、特に炭素鎖8のオクタノエート(octanoate)の酸化に関与する酸化酵素として同定された(例えば、非特許文献24参照。)。BUCS1遺伝子の発現は主に肝臓と腎臓で認められ、ミトコンドリア基質中に局在することが報告されており、アシル-CoAの生産に寄与していると考えられる。本酵素のExpressed Sequence Tag(EST)が前立腺癌で高く発現していることは報告されているが(例えば、特許文献3参照。)、本酵素と前立腺癌との関係は明らかにはなっていない。

【0012】

【特許文献1】

国際公開第02/10382号パンフレット

【特許文献2】

国際公開第00/24911号パンフレット

【特許文献3】

国際公開第01/60860号パンフレット

【非特許文献1】

新津洋司郎、横田淳編、「臨床家のための癌遺伝子/癌抑制遺伝子」、南江堂、1999年10月16日、P.1-46

【非特許文献2】

多比良和誠編、「遺伝子の機能阻害実験法」、羊土社、2001年9月20日、p.190-203

【非特許文献3】

「ネイチャー(Nature)」、1998年2月19日、第391巻、第6669号、p.806-811

【非特許文献4】

「マイクロバイオロジー・アンド・モレキュラー・バイオロジー・レビューズ(Microbiology and Molecular Biology Reviews)」、1998年10月、第62巻、第353-361号、p.353-361

obiology and Molecular Biology Reviews)」
、1998年12月、第62巻、第4号、p.1415-1434

【非特許文献5】

「ザ・インターナショナル・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー・アンド・セル・バイオロジー (The International Journal of Biochemistry and Cell Biology)」、1997年、7月、第29巻、第7号、p.945-949

【非特許文献6】

「ジーンズ・アンド・デヴェロップメンツ (Genes and Developments)」、2001年1月15日、第15巻、第2号、p.188-200

10

【非特許文献7】

「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)」、2001年9月11日、第98巻、第19号、p.10692-10697

【非特許文献8】

「セル (Cell)」、2002年5月3日、第109巻、第3号、p.397-407

【非特許文献9】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1997年1月24日、第272巻、第4号、p.2192-2198

20

【非特許文献10】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1999年4月16日、第274巻、第16号、p.11053-11959

【非特許文献11】

「サイエンス (Science)」、1992年10月23日、第258巻、第5082号、p.607-614

【非特許文献12】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1994年4月1日、第269巻、第13号、p.10000-10007

30

【非特許文献13】

「ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1994年9月1日、第180巻、第3号、p.945-958

【非特許文献14】

「アドバンセズ・イン・エクスペリメンタル・メディシン・アンド・バイオロジー (Advances in Experimental Medicine and Biology)」、1992年8月13日、第318巻、p.325-330

40

【非特許文献15】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1993年8月15日、第268巻、第23号、p.17240-17246

【非特許文献16】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1991年4月15日、第266巻、第11号、p.7096-7100

【非特許文献17】

50

「アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Annual Review of Biochemistry)」、1988年、第57巻、p. 915 - 956

【非特許文献18】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1990年3月25日、第265巻、第9号、p. 5226 - 5231

【非特許文献19】

「蛋白質 核酸 酵素」、1999年5月23日、第44巻、第8巻、p. 1038 - 1042

【非特許文献20】

「クリニカル・キャンサー・リサーチ (Clinical Cancer Research)」、1995年10月、第1巻、第10号、p. 1223 - 1232

【非特許文献21】

「ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー (Journal of Cell Physiology)」、1995年6月、第163巻、第3号、p. 441 - 450

【非特許文献22】

「アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (American Journal of Physiology)」、1998年4月、第274巻、第4号、第一部、p. C1065 - C1074

【非特許文献23】

「キャンサー・リサーチ (Cancer Research)」、1995年12月15日、第55巻、第24号、p. 6237 - 6243

【非特許文献24】

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2001年9月21日、第276巻、第38号、p. 35961 - 35966

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、前立腺癌細胞の発生及び/または増殖に関連する遺伝子を見出し、該癌遺伝子を用いた前立腺癌の検出方法、前立腺癌の治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法、及び前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、他の組織に比べて前立腺で発現量が高い遺伝子のうち、更に前立腺癌で発現量が高い遺伝子として、TMPM4、PLA1A及びBUCS1を見出し、該遺伝子の発現量を抑えると癌細胞の増殖を抑制できることを見出し、該遺伝子を用いた、前立腺癌の検出方法、新規前立腺癌治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法を開発し、更に、該遺伝子の発現を抑制させる物質を提供し本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

(1) 下記の工程1)乃至4)を含む、前立腺癌の検出方法：

1) 被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；

2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；

3) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分における、下記の1)乃至3)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

- 2 配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、
- 3 配列表の配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、
- 4) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程1)に記載の被験者の前立腺癌を検出する工程、
- (2) 下記の工程1)乃至3)を含む、前立腺癌の検出方法：
- 1) 被験者より採取した検体における、下記の1乃至3のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程；
- 1 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、
- 2 配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、
- 3 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、
- 2) 正常人から採取した検体における、上記工程1)の1乃至3のいずれか一つに記載の蛋白質の発現量を測定する工程；
- 3) 上記工程1)で検出された蛋白質の発現量と上記工程2)で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者または被験動物の前立腺癌を検出する工程、
- (3) 下記の工程1)乃至4)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：
- 1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNA画分を抽出する工程；
- 2) 被験物質を添加しないで培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNA画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分における、下記の1乃至3のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- 1 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、
- 2 配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、
- 3 配列表の配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、
- 4) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程、
- (4) 下記の工程1)乃至4)を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法：
- 1) 被験物質を投与した哺乳動物個体より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 2) 被験物質を投与しなかった哺乳動物個体より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分における、下記の1乃至3のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドまたはその部分ポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- 1 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチド、
- 2 配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、
- 3 配列表の配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

4) 上記工程 1) 由来の全 RNA 画分と上記工程 2) 由来の全 RNA 画分との間における上記工程 3) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程、

(5) 下記の工程 1) 乃至 3) を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法:

1) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程;

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、

2) 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

3) 配列表の配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

2) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、上記工程 1) の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程;

3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と、上記工程 2) で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程、

(6) 下記の工程 1) 乃至 3) を含むことからなる、前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法:

1) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体における、下記の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程;

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質、

2) 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

3) 配列表の配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、

2) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した検体における、上記工程 1) の 1) 乃至 3) のいずれか一つに記載の蛋白質またはその部分ポリペプチドの発現量を測定する工程;

3) 上記工程 1) で検出された蛋白質の発現量と、上記工程 2) で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程、

(7) トランジエント・レセプター・ポテンシャル・カチオン・チャンネル, サブファミリー M, メンバー 4 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4: 以下、「TRPM4」とする。)の陽イオン透過チャンネルを阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程 1) 乃至 3) を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

1) TRPM4 を細胞表面に発現している細胞を供給する工程;

2) Ca^{2+} の存在下において 1) に記載の細胞と被験物質を接触する工程;

3) 細胞内への陽イオンの取り込みが減少するかどうかを決定する工程(ここで、細胞内への陽イオンの取り込みが減少することは被験物質が TRPM4 の陽イオン透過チャンネルを阻害していることを示す。)

(8) フォスホリパーゼ A1 活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程 1) 及び 2) を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

1) フォスホリパーゼ A1 メンバー A の基質とフォスホリパーゼ A1 メンバー A を被

10

20

30

40

50

験物質と接触する工程；

2) 被験物質の存在下で基質を加水分解する活性が減少するかどうかを決定する工程(ここで、基質を加水分解する活性が減少することは被験物質がフォスホリパーゼA1活性を阻害することを示す。)、

(9) ブチリル・コエンザイムA・シンターゼ1(butyryl Coenzyme A synthetase 1:以下、「BUCS1」という。)のアシル-CoAの合成活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程1)乃至2)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

1) BUCS1の基質とBUCS1を被験物質と接触する工程;

2) 被験物質の存在下でアシル-CoAの合成量が減少するかどうかを決定する工程(ここで、アシル-CoAの合成量が減少することは被験物質がBUCS1のアシル-CoAの合成活性を阻害することを示す。)、

(10) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンプロット法、ドットプロット法、スロットプロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはランオン・アッセイであることを特徴とする、請求項1、3及び4のいずれか一つに記載の方法、

(11) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が動物組織または動物細胞由来の相補的DNA群または該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップまたはアレイを用いることを特徴とする請求項1、3及び4のいずれか一つに記載の方法、

(12) 蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いることを特徴とする、(2)、(5)及び(6)のいずれか一つに記載の方法、

(13) 蛋白質の発現量の測定方法が、ウエスタンプロット法、ドットプロット法、スロットプロット法または固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、(2)、(5)及び(6)のいずれか一つに記載の方法、

(14) 下記の1)乃至3)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果判定用キット:

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー;

2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ;

3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料、

(15) 下記の1)及び2)の少なくとも一つを含む、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果判定用キット:

1) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列

10

20

30

40

50

番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；

2) 上記 1) に記載の抗体に結合し得る二次抗体、

(16) 下記の 1) 乃至 3) からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む、前立腺癌の検出用キット；

1) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを特異的に増幅するための 15 乃至 30 塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；

10

2) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための 15 ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；

3) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料、

20

(17) 下記の 1) 及び 2) の少なくとも一つを含む、前立腺癌の検出用キット；

1) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；

30

2) 上記 1) に記載の抗体に結合し得る二次抗体、

(18) 下記の 1) 乃至 5) からなる群から選択されるいずれか一つのヌクレオチド配列または該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含む前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物；

1) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列；

2) 配列表の配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列；

3) 配列表の配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列；

4) 配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列；

5) 配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列、

40

(19) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質を特異的に認識する抗体を含有する前立腺癌の治療及び/または予防用医薬組成物、からなる。

【0015】

【発明の実施の形態】

本明細書中において、前立腺癌の治療及び/または予防効果を有する化合物とは、前立腺癌の増殖を抑制する活性、前立腺癌を縮小する活性、及び/または、前立腺癌の発生を予

50

防する活性を有する化合物をいう。なお、本明細書中においては、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。本明細書中において、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれるものとする。したがって、本発明におけるTRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子には、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のDNA、mRNA、cDNA及びcRNAが含まれる。本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。本明細書中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。また、本明細書中において、「RNA画分」とは、RNAを含んでいる画分をいう。また、本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。本明細書中において、「細胞の癌化」とは、細胞が接触阻止現象への感受性を喪失することや、足場非依存性増殖を示すこと等、細胞が異常な増殖を示すことをいい、このような異常な増殖を示す細胞を「癌細胞」という。本明細書において、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のそれぞれと「実質的に同一の蛋白質」とは、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のそれぞれが有する細胞の癌化活性等と同一の機能を有する蛋白質をいう。なお本発明における癌遺伝子(Oncogene)という語には癌遺伝子の他に癌原遺伝子、前癌遺伝子(proto-Oncogene)も含む。

10

【0016】

1. 前立腺癌で発現量が高い遺伝子の検出

TRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子は、前立腺由来・正常組織サンプルと前立腺由来・腫瘍サンプルにおける発現量の解析から前立腺由来腫瘍において有意に発現量が高いことが本発明者によって明らかとなった。また、正常な各種臓器、組織間の比較ではTRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子は他の組織では前立腺に比べ発現量が有意に低下していることが本発明者らによって見出された。TRPM4には長鎖型(TRPM4b)と単鎖型(TRPM4a)があり、単鎖型にはさらにスプライシング・バリエーション(Splicing variant)も知られているが、本明細書において「TRPM4」という用語は特に限定していない限り、これらを特に区別することなく用いている。TRPM4bのcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号1に示されており、そのオープン・リーディング・フレーム(ORF)は配列番号1のヌクレオチド番号73乃至3714に示され、アミノ酸配列は配列表の配列番号2に示されている。TRPM4aのcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号3に示されており、そのORFは配列番号3のヌクレオチド番号223乃至3342に示され、アミノ酸配列は配列表の配列番号4に示されている。TRPM4aのスプライシング・バリエーションのcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号5に示されており、そのORFは配列番号5のヌクレオチド番号324乃至3371に示され、アミノ酸配列は配列表の配列番号6に示されている。PLA1AのcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号7に示されており、そのオープン・リーディング・フレーム(ORF)は配列番号7のヌクレオチド番号32乃至1399に示され、アミノ酸配列は配列表の配列番号8に示されている。BUCS1のcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号9に示されており、そのオープン・リーディング・フレーム(ORF)は配列番号9のヌクレオチド番号69乃至1799に示され、アミノ酸配列は配列表の配列番号10に示されている。また、TRPM4bの遺伝子はGenBankにHomo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4 (TRPM4), mRNA (アクセッション番号: NM_017636)として登録されている。TRPM4aの遺伝子はGenBankにHomo sapiens TRP-related cation influx channel (TRPM4) mRNA, complete cds. (アクセッション番号: AY046396)として登録されている。TRPM4aのスプライシング・バリエーションの遺伝子はGenBankにHomo sapiens cDNA FLJ20041 fis, clone COL00423. (アクセッション番号: AK000048

20

30

40

50

)として登録されている。P L A 1 A 遺伝子は、G e n B a n k に H o m o s a p i e n s p h o s p h o l i p a s e A 1 m e m b e r A (P L A 1 A) , m R N A (ア ク セ ッ シ ョ ン 番 号 : N M _ 0 1 5 9 0 0) として登録されている。B U C S 1 は、G e n B a n k に H o m o s a p i e n s b u t y r y l C o e n z y m e A s y n t h e t a s e 1 (B U C S 1) , m R N A (ア ク セ ッ シ ョ ン 番 号 : N M _ 0 5 2 9 5 6) として登録されている。

【0017】

本明細書中において、「T R P M 4 遺伝子」とは、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの少なくともいずれか一つ、または、該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをいう。本明細書中において、「P L A 1 A 遺伝子」とは、配列表の配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または、該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをいう。本明細書中において、「B U C S 1 遺伝子」とは、配列表の配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、または、該ヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドをいう。また、本明細書中において、「T R P M 4」とは、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の少なくともいずれか一つ、該蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、カルシウムイオン存在下で陽イオン透過チャンネルとしての機能を有する蛋白質をいう。「P L A 1 A」とは、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、または、該蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フォスホリパーゼA1活性を有する蛋白質をいう。「B U C S 1」とは、配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または、該蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アシル-C o A ・シンターゼ活性を有する蛋白質をいう。

【0018】

2. 前立腺癌の検出方法

T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 は前立腺、特に前立腺癌で高い発現が認められるので、前立腺の癌化及び/または癌細胞の増殖に関与していると考えられる。なお、「検体」とは、被験者や臨床検体等から得られた、血液、体液、前立腺、精巣、陰茎、膀胱、腎臓、口腔、咽頭、口唇、舌、歯肉、鼻咽頭、食道、胃、小腸、大腸、結腸、肝臓、胆嚢、膵臓、鼻、肺、骨、軟部組織、皮膚、乳房、子宮、卵巣、脳、甲状腺、リンパ節、筋肉、脂肪組織等の組織、組織の一部または排泄物等の試料を意味するが、本発明においては前立腺か前立腺の一部がより好ましい。

【0019】

(1) T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子の発現量を利用した前立腺癌の検出方法

T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子の発現量を利用した前立腺癌の検出方法は、具体的には、以下の工程1)乃至4)を含む方法である。

- 1) 被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程1)に記載の全RNA画分と上記工程2)に記載の全RNA画分におけるT R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子の発現量を測定する工程；
- 4) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における

上記工程 3) によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程 1) に記載の被験者の前立腺癌を検出する工程。

以下、各工程を具体的に説明する。

【 0 0 2 0 】

1 工程 1) 被験者より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程 ;

検体から全 RNA 画分を抽出するに際しては、適切な実験の倫理基準に適した方法で入手したヒト由来組織を RNA 抽出用の溶媒 (例えばフェノール等、リボヌクレアーゼを不活性化作用を有する成分を含むもの) で直接溶解するか又は、該組織の細胞を破壊しないように、スクレーパーで慎重に掻きとるか、もしくはトリプシン等の蛋白質分解酵素を用いて穏やかに組織から細胞を抽出するなどの方法により、細胞を回収した後、速やかに RNA 抽出工程に移行する。

10

【 0 0 2 1 】

RNA の抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156 - 159) などを採用しうるが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。また、市販の RNA 抽出用試薬 (例えば、ISOGÉN (ニッポンジーン (株) 製)、TRIZOL 試薬 (ギブコ・ビーアールエル社製)) 等を試薬に添付のプロトコールに従って用いることもできる。

20

【 0 0 2 2 】

得られた全 RNA 画分は、必要に応じてさらに mRNA のみに精製して用いるのが好ましい。精製方法は特に限定されないが、例えばビオチン化したオリゴ (dT) プロンプに mRNA を吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ビオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用して mRNA を捕捉し洗浄操作の後、mRNA を溶出することにより、mRNA を精製することができる。また、オリゴ (dT) セルロースカラムに mRNA を吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。ただし、本発明の方法のためには、これら mRNA の精製工程は必須ではなく、検出対象のポリヌクレオチドの発現の検出が可能である限りにおいて、全 RNA 画分をその後の工程に用いることもできる。

30

【 0 0 2 3 】

2 工程 2) 正常人より採取した検体より、全 RNA 画分を抽出する工程 :

本発明において、正常人とは、癌を有さない人を意味する。正常人であるか否かは、TRPM4 遺伝子、PLA1A 遺伝子及び BUCS1 遺伝子から選択される少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かで判定することもできるし、TRPM4 遺伝子、PLA1A 遺伝子及び BUCS1 遺伝子の発現量と、前立腺癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、正常な範囲にあるとして判断することもできる。正常人よりの全 RNA 画分の調製は、上記工程 1) と同様に行うことができる。

【 0 0 2 4 】

3 工程 3) 上記工程 1) に記載の全 RNA 画分と上記工程 2) に記載の全 RNA 画分

における TRPM4 遺伝子、PLA1A 遺伝子及び BUCS1 遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子の発現量を測定する工程 :

TRPM4 遺伝子、PLA1A 遺伝子及び BUCS1 遺伝子から選択される少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量の測定方法として、固相化試料を用いた測定方法と、その他のいくつかの測定方法について説明する。

【 0 0 2 5 】

(a) 固相化試料を用いた測定方法

(i) 固相化試料

固相化試料としては、例えば以下のものが挙げられる。

40

50

【0026】

(イ) 遺伝子チップ：

データベース上のEST (expressed sequence tag) 配列又はmRNA配列をもとに合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドが固相化された遺伝子チップを用いることができる。このような遺伝子チップとしてはアフィメトリックス (Affymetrix) 社製の遺伝子チップ (Lipshutz, R. J. et al., Nature Genet. (1999) 21, supplement, 20-24) を用いることができるが、これに限定されず、公知の方法に基づき作製してもよい。ヒト細胞由来のmRNAを解析する場合には、ヒト由来のものが好ましく、例えば、アフィメトリックス社製ヒトU95セット又はU133セットを用いることができる。しかしながら、それらに限定されず、例えば近縁種の動物由来のものも使用可能である。

【0027】

(ロ) ヒト、全RNAあるいは特定の組織から得た全RNAより作製されたcDNA又はRT-PCR産物が固相化された、アレイ又はメンブレンフィルター：

上記cDNA又はRT-PCR産物は、ヒトのESTデータベース等の配列情報を基に作製されたプライマーで逆転写酵素反応やPCRを実施することによりクローン化されたものである。このcDNAやRT-PCR産物は、あらかじめ腫瘍を有するヒトと腫瘍を有さないヒトの間で発現量の異なる全RNAを、サブトラクション法 (Diatchenkii, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93, 6025-6030)、ディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P., et al. Nucleic Acids Res., (1992) 23, 3685-3690) などを利用して選択されたものであってもよい。また、アレイやフィルターは市販のもの (例えば、インテリジーン：タカラバイオ社製等) を使用してもよいし、上記cDNAやRT-PCR産物を市販のスポットターで (例えば、GMS 417アレイヤー：タカラバイオ社製等) を用いて固相化することにより作製してもよい。

【0028】

(ii) プローブの作製と解析

標識プローブは、特定のmRNAクローンではなく、発現している全てのmRNAを標識したものをを用いる。プローブ作製のための出発材料としては精製していないmRNAを用いてもよいが、前述の方法で精製したポリ(A)+RNAを用いることが望ましい。以下に、各種固相化試料を用いた場合の、標識プローブの調製方法と検出、解析方法について説明する。

【0029】

(イ) アフィメトリックス社製遺伝子チップ：

アフィメトリックス社製遺伝子チップに添付されたプロトコール (アフィメトリックス社発現解析技術マニュアル) に従ってビオチン標識したcRNAプローブを作製する。次いでアフィメトリックス社製遺伝子チップに添付のプロトコール (発現解析技術マニュアル) に従って、アフィメトリックス社製の解析装置 (GeneChip Fluidics Station 400) を用いてハイブリダイゼーション及び解析を行い、アビジンによる発光を検出、解析を行なう。

【0030】

(ロ) アレイ：

逆転写酵素反応でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、cDNAの検出ができるようにcDNAを標識しておくことが必要であり、蛍光色素で標識する場合には、蛍光色素 (例えばCy3、Cy5など) で標識されたd-UTPなどを加えておくことによりcDNAを蛍光標識する。このとき、前立腺癌細胞由来のポリ(A)⁺RNAと対照細胞由来のポリ(A)⁺RNAをそれぞれ異なる色素で標識しておけば、後のハイブリダイゼーション時には両者を混合して用いることができる。アレイとして例えば、タカラバイオ (株) 社の市販アレイを用いる場合、同社のプロトコールに従いハイブリダイゼーション及び洗浄を行って、蛍光シグナル検出機 (例えばGMS 418アレイスキャナー (タカ

ラバイオ(株)社製)等)で蛍光シグナルを検出後、解析を行う。ただし、使用するアレイとしては市販のものに限定されず、自家製のもの、特別に作製したものでよい。

【0031】

(ハ)メンブレンフィルター：

逆転写酵素でポリ(A)⁺RNAからcDNAを作製する際に、放射性同位元素(例えば、d-CTP等を加えることにより標識プローブを調製し、常法によりハイブリダイゼーションを行ない、例えば、市販のフィルター製マイクロアレイである、アトラスシステム(クロンテック社製)を用いてハイブリダイゼーション及び洗浄を行なった後、解析装置(例えば、アトラスイメージ：クロンテック社製等)を用いて検出、解析を行なう。

【0032】

前記(イ)乃至(ハ)のいずれに記載の方法も、同一ロットの固相化試料にヒト各組織由来のプローブをハイブリダイズさせる。このとき、使用するプローブ以外のハイブリダイゼーション以外の条件は同じとする。蛍光標識プローブを用いる場合には、それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識しておけば一つの固相化試料に両プローブの混合物を一度にハイブリダイズさせて蛍光強度を読み取ることができる(Brown, P. O. et al. Nature Genet., (1999) 21, supplement, p. 33-37)。

【0033】

(b) その他の測定方法

上記以外の測定方法としてサブトラクションクローニング法(実験医学別冊新 遺伝子工学ハンドブック、羊土社刊(1996) p. 32-35参照)、ディファレンシャルディスプレイ法(基礎生化学実験法4 核酸・遺伝子実験 II. 応用編、東京化学同人(2001), p. 125-128)、レポーター遺伝子を用いた方法(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(例えば、pCAT3-Basicベクター：プロメガ社製を使用。))やβ-ガラクトシダーゼ(例えば、p-gal-Basic：プロメガ社製を使用。))、分泌型アルカリホスファターゼ(例えば、pSEAP2-Basic：クロンテック社製を使用。))、緑色蛍光蛋白質(green-fluorescent protein)(例えば、pEGFP-1：クロンテック社製を使用。))があるがこれらに限定されない。

【0034】

4 工程4)上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程1)に記載の被験者の前立腺癌を検出する工程。

【0035】

正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でTRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量の差を解析し、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子から選択される少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量が有意に増加している検体では癌、特に前立腺癌が存在する可能性が高いと判定することができ、前立腺癌を検出することができる。発現量が有意に増加しているとは、例えば、アフィメトリックス社の遺伝子チップを用いて、アフィメトリックス社のMicroarray Suite Ver. 3.0を用いて解析した場合、前立腺癌細胞由来の遺伝子の遺伝子発現量(Average difference値)が正常な前立腺細胞に比べて有意に増加している場合をいう。なお、該検出は、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子から選択されるいずれか一つの遺伝子の発現量を個別に評価して行うことも可能であるし、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の発現量を総合的に評価して行うこともできる。

【0036】

また、TRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子の濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には前立腺癌を有すると判定することで前立腺癌を検出すること

10

20

30

40

50

もできるし、TRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子の発現量と、正常人の前立腺癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるTRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子の発現量を測定することによって被験者が、前立腺癌を有するか否を判定することもできる。

【0037】

(2) TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を利用した前立腺癌の検出方法

TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を利用した前立腺癌の検出方法は、具体的には、以下の工程1)乃至3)を含む方法である。

10

1)被験者より採取した検体における、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程：

2)正常人より採取した検体における、上記1)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程：

3)上記工程1)で測定された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の前立腺癌を検出する工程。

以下、各工程を具体的に説明する。

【0038】

1 工程1)被験者より採取した検体における、TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程：

20

(a) 検体より蛋白質測定用試料の調製

検体は、必要に応じて高速遠心を行うことにより、不溶性の物質を除去した後、以下のようにELISA/RIA用試料やウエスタンブロット用試料として調製する。

【0039】

ELISA/RIA用試料としては、例えば回収した、前立腺をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものをを用いる。ウエスタンブロット用(電気泳動用)試料は、例えば、前立腺または前立腺の一部の抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の2-メルカトリエタノールを含むサンプル緩衝液(シグマ(Sigma)社製等)と混合する。ドット/スロットブロットの場合は、例えば回収した前立腺または前立腺の一部の抽出液そのもの、または緩衝液で適宜希釈したものを、プロッティング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

30

【0040】

(b) 試料の固相化

上記のようにして得られた試料中の蛋白質を特異的に検出するためには、試料を免疫沈降法、リガンドの結合を利用した方法等によって、沈殿させ、固相化せずに検出することもできるし、そのまま検出する該試料を固相化することもできる。蛋白質を固相化する場合において、ウエスタンブロット法、ドットブロット法またはスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン(例えば、バイオラッド社製等)、ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-ECL(アマシャム・ファルマシア社製)等)、コットンメンブレン(例えば、ブロットアブソーベントフィルター(バイオラッド社製)等)またはポリビニリデン・ジフルオリド(PVDF)メンブレン(例えば、バイオラッド社製等)等が挙げられる。

40

【0041】

ELISA法/RIA法で蛋白質の検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート(例えば、イムノプレート・マキシソープ(ヌンク社製)等)に試料またはその希釈液(例えば0.05%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」という)で希釈したものを)を入れて4乃至室温で一晩、または37で1乃至3時間静置することにより、ウエル内底面に蛋白質を吸着させて固相化する。

【0042】

TRPM4、PLA1A及びBUCS1に対する抗体は、常法を用いて(例えば、新生化

50

学実験講座1、蛋白質1、p.389-397、1992参照。)、TRPM4、PLA1A及びBUCS1またはTRPM4、PLA1A及びBUCS1のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法(例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Plenum Press, N.Y.)に従って、TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択されるいずれかの蛋白質に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

10

【0043】

なお、抗原となるTRPM4、PLA1A及びBUCS1はTRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したTRPM4、PLA1A及びBUCS1を精製すればよい。

【0044】

(c) TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量の測定

発現量の測定は、抗TRPM4抗体、抗PLA1A抗体及び抗BUCS1から選択されるいずれかの抗体を用いてウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法等公知の方法を用いて測定することができる。

20

【0045】

2 工程2) 正常人より採取した検体における、上記1)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程:

正常人より採取した検体におけるTRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択されるいずれかの蛋白質の発現量の測定は上記工程1)と同様の方法で行うことができる。

【0046】

3 工程3) 上記工程1)で測定された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の前立腺癌を検出する工程。

30

【0047】

正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でTRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量の差を解析し、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の発現量が有意に増加している検体では癌、特に前立腺癌が存在する可能性が高いと判定することができる。なお、該判定は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択されるいずれか一つの蛋白質の発現量に基づいて個別に行うこともできるし、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の発現量を総合的に評価して行うこともできる。

【0048】

また、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には前立腺癌を有すると判定することで前立腺癌を検出することもできるし、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の発現量と、正常人の前立腺癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるTRPM4、PLA1A及びBUCS1の発現量を測定することによって被験者が、前立腺癌を有するか否かを判定することもできる。

40

【0049】

3. TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の検定

TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及

50

びBUCS1の発現量は、ヒトの正常組織の間では前立腺に比べ他の組織では有意に低下しており、更に、正常な前立腺に比べ、前立腺癌で発現量が有意に増加していることが本発明者らによって見出された。TRPM4、PLA1A及びBUCS1の機能は以下の方法によって調べることができる。

【0050】

(1) TRPM4、PLA1A及びBUCS1の機能を調べる第1の方法としては、まず、TRPM4、PLA1A及びBUCS1を発現している細胞由来のヒトcDNAライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法等、公知の方法に従い、完全長cDNAを取得する。この完全長cDNAをマウス又はヒト細胞に導入して高発現させ、細胞に影響が生じるか否かを検討する。

10

【0051】

cDNAを動物個体内で発現させるためには、得られた完全長cDNAをウイルスベクターに組み込み、動物に投与する方法が挙げられる。ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス等のDNAウイルス、又はRNAウイルスにcDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。なかでも、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が好ましい。

【0052】

非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、なかでも、DNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

20

【0053】

また、培養細胞に対して、完全長cDNAをヒト、マウス、ラット等由来の筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、あるいは筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、皮膚細胞、前立腺細胞等へ導入し、高発現させ、各標的細胞の有する機能、具体的には、糖や脂質の産生や取り込み、あるいはグリコーゲンの蓄積等の糖脂質代謝を調節する機能、あるいは細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することができる。

【0054】

完全長cDNAを動物又は細胞に導入するにあたっては、適当なプロモーター及び形質発現に関わる配列を含むベクターに該cDNAを組み込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換させる。脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子の upstream に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. et al., Mol. Cell. Biol., (1981) 1, p. 854 - 864)、レトロウイルスベクターpLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR (クロンテック (Clontech) 社製)、コスミドベクターpAxCw (タカラバイオ社製) 等が挙げられるが、これに限定されない。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル (DEAE) - デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res. (1983) 11, p. 1295 - 1308)、リン酸カルシウム - DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. Virology, (1973) 52, p. 456 - 457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. (1982) 1, p. 841 - 845) などによりサルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175 - 182, ATCC: CRL - 1650) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞、ATCC: CCL - 61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci.

30

40

50

USA (1980) 77, p. 4126-4220)、ヒト胎児腎臓由来293細胞(ATCC:CRL-1573)等に取り込ませることができるが、これらに限定されない。かくして所望の形質転換体を得ることができる。

【0055】

また、遺伝子操作により、正常動物において、目的とする遺伝子が高発現するようにトランスジェニック動物を作製し、細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することも可能である。逆に、前立腺癌を有する動物において、対象とする遺伝子を破壊したノックアウト動物を作製し細胞の状態を判定することができる。

【0056】

(2) TRPM4、PLA1A及びBUCS1の機能を調べる第2の方法としては、癌細胞株においてTRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つの発現を抑制し、細胞の機能や増殖の形態にどのような影響が出るかを調べることもできる。

【0057】

試験する遺伝子の全RNAに対するアンチセンス核酸を、細胞に導入し、各標的細胞の機能や形態にどのような影響が出るかを調べることもできる。

【0058】

遺伝子の発現を抑制する他の方法としては二本鎖の単鎖RNA(sRNA)を用いる方法を挙げることができる(「ジーンズ・アンド・デヴェロップメント(Genes and Developments)」)、2001年1月15日、第15巻、第2号、p. 188-200)。例えば、ヒト前立腺細胞株LNCaP(American Tissue Culture Collection ATCC No.: CRL-1740)あるいはヒト前立腺癌細胞株PC-3(American Tissue Culture Collection ATCC No.: CRL-1435)に対してTRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子のいずれかの遺伝子に対するsRNAを文献記載の方法に従って導入し、sRNAの対象となる遺伝子の発現量及び細胞の増殖率を調べると、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子のいずれの発現量を抑制した場合にも細胞の増殖の抑制が観察される。すなわち、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の発現量の増大が前立腺癌の増殖に関係していることが明らかとなる。

【0059】

4. TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及びBUCS1、及び/または、TRPM4、PLA1A及びBUCS1検出用キットTRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及びBUCS1、及び/または、TRPM4、PLA1A及びBUCS1は、以下の1)乃至5)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含むキットを用いて検出することができる。

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー;

2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ;

3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番

10

20

30

40

50

号3に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号5に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、配列番号7に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号9に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる群から選択される少なくともいずれか一つのポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

4) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質からなる群から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；

10

5) 上記4)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

【0060】

前記1)に記載のプライマーは、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子のヌクレオチド配列に基づき市販のプライマー設計ソフト(たとえば、Wisconsin GCG package Version 10.2)を用いる等、常法により容易に設計し、増幅することができる。また、前記2)に記載のプローブは、TRPM4、PLA1A及びBUCS1に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、100乃至1500塩基長、好ましくは300乃至600塩基長である。これらのプライマーやプローブは、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてよく、また、リンカーを付加していてもよい。

20

【0061】

上記3)に記載の固相化試料は、上記2)に記載のプローブをガラス板、ナイロンメンブレン等の固相に固定することにより作製される。このような固相化試料の作成方法については、既に「2.前立腺癌の検出方法」の項中、「(1)TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子から選択される少なくとも一つの遺伝子の発現量を利用した前立腺癌の検出方法」の項で説明した通りであり、例えば、遺伝子チップ、cDNAアレイ、オリゴアレイ、メンブレンフィルター等を挙げることができる。

【0062】

本発明のキットには、更に耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物)及び緩衝液を含めることもできる。耐熱性DNAポリメラーゼとしてはTaq DNAポリメラーゼ、LA Taq DNA polymerase(宝酒造社製)、Tth DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼなどが例示できる。緩衝液は使用するDNAポリメラーゼに応じて選ばれ、必要に応じてMg²⁺などが添加されている。

30

【0063】

前記、4)及び5)に記載の抗体は上記「2.前立腺癌の検出方法」の項中「(2)TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択される少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を利用した前立腺癌の検出方法」や下記の「6.抗TRPM4、PLA1A及びBUCS1抗体の製造」の項に記載した方法により作製することができる。該抗体は、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてよい。

40

【0064】

本発明のキットはTRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及びBUCS1、及び/または、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の検出に用いることができ、前立腺癌の有無の判定や、前立腺癌の増殖を抑制する物質のスクリーニングにも用いることができる。

【0065】

5.前立腺癌の治療効果及び/または予防効果を有する物質のスクリーニング方法
本発明の一つの態様として、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子、TRPM4、PLA1A及びBUCS1、及び/または、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくとも一つの発現量を測定することによって前立腺癌に対して治療及び

50

／または予防効果を有する物質のスクリーニングをすることができる。

【0066】

本発明の一つの態様として、TRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択されるいずれか一つの蛋白質の活性を阻害する物質を同定することによって、前立腺癌に対する治療効果及び／または予防効果を有する物質をスクリーニングすることができる。

【0067】

なお、「被験物質」とは、本発明のスクリーニング方法で癌の増殖抑制活性を調べる対象となる物質をいう。被験物質としては、化合物、微生物の代謝産物、植物や動物組織の抽出物、それらの誘導体またはそれらの混合物等が挙げられる。また、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくとも一つの発現量を低下するように設計された核酸またはその誘導体（アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、dsRNA、siRNA等を含む）を、被験物質として使用することも可能である。被験物質の投与量や濃度は適宜設定するか、または例えば希釈系列を作成するなどして複数種の投与量を設定してもよく、固体、液体等適当な状態で投与することができ、適当なバッファーに溶解したり、安定化剤等を加えてもよい。培養細胞を用いるスクリーニング方法の場合には、培地に添加して培養することができる。培地に添加する場合には培養開始時から添加してもよいし、培養途中で添加しても良く、また、添加の回数も1回に限らない。被験物質存在下で培養する期間も適宜設定してよいが、好ましくは30分乃至2週間であり、より好ましくは、30分乃至48時間である。哺乳動物個体に被験物質を投与する場合は、被験物質の物性等により経口投与、静脈注射、腹腔内注射、経皮投与、皮下注射等の投与形態を使い分ける。また、前立腺癌に直接塗布または注射することもできる。なお被験物質の投与から、検体を得るまでの時間は適当に選択することができる。

【0068】

本発明のスクリーニング方法において用いられる培養細胞は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを発現する哺乳動物細胞である限りにおいて、正常な細胞でも、癌細胞等の異常な増殖を示す細胞でもよく、例えば、マウス繊維芽細胞由来細胞株NIH3T3細胞、ヒト前立腺癌細胞株LNCaP、ヒト前立腺癌細胞株PC-3、マウス、ラット及びヒト遊離脂肪細胞、マウス、ラット及びヒト初代肝細胞等を挙げることができるがこれらに限定されない。培養細胞の哺乳動物種としては、ヒト、マウスまたはハムスターが好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましいが、これらに限定されない。なお、培養細胞としてはTRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを過剰発現している哺乳動物細胞を用いるのがより好ましく、例えばTRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子をそのプロモーター領域とともに導入し、TRPM4、PLA1A及びBUCS1を過剰発現するNIH3T3細胞などを挙げることができる。

【0069】

腫瘍細胞では以下に示す、1 フォーカス形成、2 コロニー形成、3 スフェロイド増殖等の正常な細胞とは異なる異常な増殖を示す場合が多い。従って、かかる増殖を低減する物質は癌の治療効果及び／または予防効果を有する物質である可能性が高い。これらの性質は具体的には以下の通りである。

【0070】

1 フォーカス形成試験

NIH3T3をはじめとする正常繊維芽細胞は、通常、増殖して密集状態になっても細胞が重なり合うことはなく、単層を形成したところで増殖は止まる。一方、形質転換した細胞、癌細胞では、接触阻止現象への感受性が喪失しており、重なり合いながら増殖を続けることが可能であり、何層にも重なった細胞集団を形成し、単層の細胞の広がりの中に高密度の細胞塊であるフォーカス（Focus）を作るという特性を持つ（横田淳、山本雅編、バイオマニュアルUPシリーズ癌研究プロトコール 羊土社 168-174（1995年10月15日刊行）。この現象は、例えば、培養細胞に癌ウイルスを感染させた場合に観察されることから、癌ウイルスの定量にも用いられる場合もあるのみならず（Fundamental Techniques in Virology, Acade

10

20

30

40

50

c Press (1969), p 198 - 211)、ウイルスや細胞由来の癌遺伝子を含むDNA断片を細胞にトランスフェクションすることによっても観察することができることから、癌遺伝子、癌抑制遺伝子のスクリーニングに用いられる。

【0071】

TRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子を過剰発現させた細胞株と過剰発現させなかった細胞株を通常の方法で培養し、新鮮な培養液に置換した後にマルチウェルプレート(例えば96穴プレート:コーニング-コスター社製3598)に分注し一定時間培養した後に各ウェルあたりのフォーカス数を測定する。各ウェルあたりのフォーカス数を集計した後統計処理を行ない、各ウェルあたりの平均フォーカス数及び標準偏差を算出する。TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つを過剰発現させたNIH3T3細胞ではTRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子を過剰発現させなかった細胞に比べ、フォーカス数が顕著に増加していることが観察される。

10

【0072】

2 コロニー形成試験

正常な細胞は、血液細胞を除き、接着する足場のない状態におくと増殖できないことが知られる。これに対して形質転換した細胞、癌細胞は、足場のない状態でも増殖しうる特性をもつ。この特性変化は、これは軟寒天培地中における増殖コロニーの形成で容易に調べることが可能である(横田淳、山本雅編、バイオマニュアルUPシリーズ 癌研究プロトコル 羊土社 168-174(1995年10月15日刊行))。

【0073】

TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つを過剰発現させた細胞株と過剰発現させなかった細胞株を通常の方法で培養し、新鮮な培養液に置換した後に軟寒天培地(例えば0.33% Bactoagar(Difco社製)及び20% FCS含有RPMI1640)に懸濁し、寒天培地(例えば0.66% Bactoagar及び20% FCS含有RPMI1640)の上に重層する。通常の方法(例えば37、5%CO₂)で培養し、形成された軟寒天中の増殖コロニー数を測定する。マルチウェルプレート(例えば12穴プレート:コーニング-コスター社製3512)を用いて培養した場合には、一定時間培養した後に各ウェルあたりのコロニー数を測定する。各ウェルあたりのコロニー数を集計した後統計処理を行ない、各ウェルあたりの平均コロニー数及び標準偏差を算出する。TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つを過剰発現させたNIH3T3細胞株ではTRPM4、PLA1A及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれかひとつを過剰発現させなかった細胞に比べ、コロニー数が顕著に増加していることが観察される。

20

30

【0074】

3 スフェロイド(Spheroid)増殖試験

形質転換した細胞、癌細胞の足場非依存的な増殖という特性は、スフェロイド(Spheroid)状態での培養によっても容易に評価することができる。スフェロイドは細胞が多数集合した凝集体のことであり、細胞接着を極めて低く抑えた培養プレートでの培養によって容易に形成しうる。スフェロイド状態での培養は、通常の方法とは異なり、「2 コロニー形成試験」に示したのと同様に足場非依存的な状態での培養に類似し、生体内に近い条件下で機能を観察することができる(住友ベークライト社SUMILON理化学機器総合カタログ)。TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つを過剰発現させた細胞株と該遺伝子を過剰発現させなかった細胞株を通常の方法で培養し、新鮮な培養液に置換し、細胞非付着性マルチウェルプレート(例えばスフェロイド96U:住友ベークライト社製MS-0096S)に分注する。通常の方法(例えば、37、5%CO₂)で培養し、培養開始後一定時間経過後にプレート上に形成されるスフェロイドの大きさを測定する。スフェロイドの大きさは例えば顕微鏡下、接眼方眼マイクロメータ(三啓社製:S-6)を用いて測定することができる。スフェロイドの大きさを指標としてスフェロイドの直径を用いることができる。TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つを過剰発現させた

40

50

N I H 3 T 3 細胞株では該遺伝子を過剰発現させなかった細胞に比べ、スフェロイドの直径の顕著な増加が観察される。

【0075】

本発明のスクリーニング方法には、培養細胞を用いず、哺乳動物個体に被験物質を投与して、その後該動物個体から摘出されたその臓器または組織細胞における T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つの発現を検出する方法も含まれる。遺伝子発現の検出対象となる臓器または組織は、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 を発現するものであればよいが、好ましくは癌が発生している組織であり、より好ましくは前立腺である。哺乳動物種としては非ヒト哺乳動物を用いることができ、マウス、ラットまたはハムスターが好ましく、マウスまたはラットがより好ましい。なお、ヒト、サル、マウスまたはラット由来の腫瘍を皮下、皮内あるいは腹腔等に移植した腫瘍モデル動物である、担癌動物（ヒト癌株を移植したヌードマウス、同種移植マウスなど）、あるいは、癌を自然発生する系統の動物（天然に同定された動物及び遺伝子改変動物を含む。例えば、p 5 3 ノックアウトマウス（D o n e h o w e r ら、N a t u r e (1 9 9 2)、3 5 6 巻、p . 2 1 5 - 2 2 1)、M y c トランスジェニックマウス（A d a m s ら、N a t u r e (1 9 8 5)、3 1 8 巻、p . 5 3 3 - 5 3 8)、T R A M P マウス（F o s t e r ら、C a n c e r R e s . (1 9 9 7)、5 7 巻、p . 3 3 2 5 - 3 3 3 0) などを用いることもできる。更に、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つを過剰発現させた動物を用いることもできる。また、癌誘発処置を行なった動物を用いることもできる。

10

20

【0076】

本発明の方法において用いられる培養細胞は、被験物質を添加しない場合に T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つを発現可能な条件であれば、いかなる条件で培養してもよい。例えば、該培養細胞について公知の培養条件が知られており、該条件下において該細胞が T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つを発現する場合は、該条件で培養してもよい。また、哺乳動物個体から摘出した臓器または組織における T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現を検出する場合における、該動物の飼育条件も、被験物質を添加しない場合に T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 から選択される少なくともいずれか一つを発現可能な条件であればよい。

30

【0077】

なお、被験物質の、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現に対する影響を調べるためには、T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量を測定する方法と、T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つの翻訳産物である、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現量を測定する方法がある。T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子、及び / または、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現を抑える被験物質は癌、好適には前立腺癌に対する治療効果及び / または予防効果を有する物質であると考えられる。

40

【0078】

培養細胞からの、全 R N A の抽出、T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量の測定、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量の測定については、上記「2. 前立腺癌の検出方法」の項に記載した方法に従って行うことができる。

【0079】

(1) T R P M 4 遺伝子、P L A 1 A 遺伝子及び B U C S 1 遺伝子の少なくともいずれか一つを用いる方法

本発明のスクリーニング方法としては例えば、哺乳動物由来培養細胞を用いる方法、及び哺乳動物個体を用いる方法についてそれぞれ以下のようになる。

50

【 0 0 8 0 】

1 哺乳動物由来培養細胞を用いる方法

(i) 以下の工程イ)乃至八)を含む：

イ)被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNAを抽出する工程；

ロ)イ)由来の全RNAと被験物質を添加しないで培養した哺乳動物培養細胞由来全RNAの間における、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つの発現量の差を検出する工程；

ハ)ロ)に記載の遺伝子の発現量の差を解析し、被験物質の、前立腺癌に対する治療、及び/または予防効果を判定する工程。

10

【 0 0 8 1 】

(i i) 以下の工程イ)乃至二)を含む。

イ)被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNA画分を抽出する工程；

ロ)被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞より、全RNA画分を抽出する工程；

ハ)上記イ)由来の全RNA画分とロ)由来の全RNA画分における、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量を測定する工程；

ニ)上記イ)由来の全RNA画分とロ)由来の全RNA画分との間における上記ハ)によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、被験物質の、前立腺癌に対する治療、及び/または治療効果を判定する工程。

20

【 0 0 8 2 】

2 哺乳動物個体を用いる方法

(i) 以下の工程1)乃至3)を含む。

イ)被験物質を投与した哺乳動物個体より採取した検体より、全RNAを抽出する工程；

ロ)イ)由来の全RNAと被験物質を投与しなかった動物個体より採取した検体より得た全RNAの間における、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量の差を検出する工程；

ハ)上記ロ)に記載の遺伝子の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療、及び/または予防効果を判定する工程。

30

【 0 0 8 3 】

(i i) 以下の工程イ)乃至二)を含む。

イ)被験物質を投与した哺乳動物個体より採取した検体より、全RNAを抽出する工程；

ロ)被験物質を投与しなかった哺乳動物個体より採取した検体より、全RNAを抽出する工程；

ハ)上記工程イ)由来の全RNAと上記工程ロ)由来の全RNAにおける、TRPM4遺伝子、PLA1A遺伝子及びBUCS1遺伝子の少なくともいずれか一つの遺伝子の発現量を測定する工程；

ニ)ハ)に記載の遺伝子の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療及び/または予防効果を判定する工程。

40

【 0 0 8 4 】

(2) TRPM4、PLA1A及びBUCS1を用いる方法

TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つの発現量を測定することを利用したスクリーニング方法については哺乳動物培養細胞を用いた方法と動物個体を用いた方法についてそれぞれ以下の工程を含む。

【 0 0 8 5 】

1 哺乳動物由来培養細胞を用いる方法

(i) 以下の工程1)及び2)を含む：

イ)被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、TRPM4、P

50

L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現量を測定する工程；
 ロ) イ) で測定された蛋白質の発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【 0 0 8 6 】

(i i) 以下の工程イ)乃至八)を含む：

イ) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程；
 ロ) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞における、上記イ)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程；

10

ハ) 上記イ) で測定された蛋白質の発現量と、上記ロ) で測定された該蛋白質の発現量の差を検出し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【 0 0 8 7 】

(i i i) 以下の工程イ)乃至八)を含む：

イ) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全蛋白質を固相化する工程；

ロ) 上記固相化蛋白質における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程；

ハ) 上記ロ) で検出された T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の発現量と、被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全蛋白質における該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

20

【 0 0 8 8 】

(i v) 以下の工程イ)乃至ホ)を含む：

イ) 被験物質を添加した培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全蛋白質を固相化する工程；

ロ) 被験物質を添加しない培地で培養した哺乳動物由来培養細胞から得た全蛋白質を固相化する工程；

ハ) 上記工程イ)に記載の固相化蛋白質における T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

30

ニ) 上記工程ロ)に記載の固相化蛋白質における T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

ホ) 上記工程ハ)で測定された蛋白質の発現量と、上記工程ニ)で測定された蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【 0 0 8 9 】

2 哺乳動物個体を用いる方法

40

(i) 以下の工程イ)及びロ)を含む：

イ) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程；

ロ) 上記工程イ)で測定された T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの発現量と、被験物質を投与されなかった哺乳動物個体から採取した検体における該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【 0 0 9 0 】

(i i) 以下の工程イ)乃至八)を含む：

イ) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体における、T R P M 4、P L A

50

1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて測定する工程；

ロ) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した検体における、該蛋白質の発現量を測定する工程；

ハ) イ) で測定された T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量と、ロ) で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程。

【0091】

(i i i) 以下の工程イ)乃至ハ)を含む：

イ) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体中の全蛋白質を固相化する工程 10

ロ) 上記固相化蛋白質における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を測定する工程；

ハ) 上記ロ) で検出された T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量と、被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した検体中における該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療及び/または予防効果を判定する工程。

【0092】

(i v) 以下の工程イ)乃至ホ)を含む：

イ) 被験物質を投与された哺乳動物個体より採取した検体中の全蛋白質を固相化する工程 20

ロ) 被験物質を投与されなかった哺乳動物個体より採取した検体中の全蛋白質を固相化する工程；

ハ) 上記工程イ) に記載の固相化蛋白質における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；

ニ) 上記ロ) に記載の固相化蛋白質における、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの蛋白質の発現量を該蛋白質に特異的に結合する抗体またはリガンドを用いて検出する工程；

ホ) 上記ハ) で検出された蛋白質の発現量と、上記ニ) で検出された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験物質の前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を判定する工程 30

【0093】

(3) T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかの活性を阻害する物質を同定することによる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法

T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 は正常な前立腺に比べ前立腺癌で有意に発現量が増加しているため、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの活性を阻害する物質は前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質となり得る。T R P M 4 はカルシウムイオン存在下で陽イオン透過チャンネルとしての機能を有する(例えば、Cell, 2002, Vol. 109, p397-407及びProc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol. 98, p10692-10697参照)。P L A 1 A はフォスホリパーゼ A 1 (Phospholipase A1) メンバー蛋白質であり、フォスホリパーゼ A 1 活性を有する。フォスホリパーゼ A 1 活性とはリン脂質のグリセロールの1位(リン酸エステルが結合している部位を3位とした場合)における脂肪酸とのエステル結合を特異的に加水分解する活性である。B U C S 1 はアシル-CoA・シンターゼ(Acyl-CoA Synthetase)の1種であり、炭素数4~16の脂肪酸、好適にはオクタン酸をアシル-CoA (Acyl-CoA) に活性化する活性を有する酵素である。以下、T R P M 4、P L A 1 A、B U C S のそれぞれについて活性を阻害する物質を取得することを特 50

徴とする、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法を示す。

【0094】

1 TRPM4

TRPM4の陽イオン透過チャンネルを阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程イ)乃至八)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

- イ) TRPM4を細胞表面に発現している細胞を供給する工程;
- ロ) Ca^{2+} の存在下においてイ)に記載の細胞と被験物質を接触する工程;
- ハ) 細胞内への陽イオンの取り込みが減少するかどうかを決定する工程(ここで、細胞内への陽イオンの取り込みが減少することは被験物質がTRPM4の陽イオン透過チャンネルを阻害していることを示す。)

10

【0095】

以下、各工程を更に詳しく説明する。

イ) TRPM4を細胞表面に発現している細胞は、当業者に公知の方法で取得することができ、例えば、Cell, 2002, Vol. 109, p397-407に記載されている方法で取得することができる。すなわち、TRPM4のcDNAをアミノ末端にフラッグ・エピトープ・タグ(Flag epitope tag)を付けたpCDNA4/TO vector(インビトロジェン社製)に挿入し、そのプラスミドをあらかじめpCDNA6/TR(インビトロジェン社製)で形質転換されたHEK-293細胞に

20

エレクトロポレーションで導入し、ゼオシンを用いて細胞表面にフラッグ・タグが付いたTRPM4が発現している細胞を選択する。
ロ) Ca^{2+} の存在下においてイ)に記載の細胞と被験物質を接触する工程においては、フラッグ・タグが付いたTRPM4を細胞表面に発現するHEK-293細胞を Ca^{2+} を含む適当な培地で培養し、被験物質を添加する。なお、細胞の培養は例えば、Cell, 2002, Vol. 109, p397-407に記載されている方法に準じて行うことができる。また、被験物質の濃度は測定条件に応じて適当に定めることができる。
ハ) 細胞内への陽イオンの取り込みが減少するかどうかを決定する工程における、細胞内の陽イオン濃度の測定は、例えば、Cell, 2002, Vol. 109, p397-407に記載されている方法に準じて行うことができるがこれらの方法に限られず、

30

例えば、FLIPR Calcium Assay KitやFLIPR Membrane Potential Assay Kit(Molecular Devices社)等を用いて測定することもできる。
このような方法によって測定された細胞内の陽イオン濃度の上昇が被験物質を添加しない場合に比べ減少する場合、被験物質はTRPM4の陽イオン透過チャンネルを阻害していることを示し、そのような被験物質はTRPM4の陽イオン透過チャンネルを阻害する物質であると同定され、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質であると決定することができる。

【0096】

2 PLA1A

フォスホリパーゼA1活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程イ)及びロ)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法:

- イ) PLA1Aの基質とPLA1Aを被験物質と接触する工程;
- ロ) 被験物質の存在下で基質を加水分解する活性が減少するかどうかを決定する工程(ここで、基質を加水分解する活性が減少することは被験物質がフォスホリパーゼA1活性を阻害することを示す。)

40

【0097】

以下、各工程を更に詳しく説明する。

【0098】

50

イ) P L A 1 A の基質と P L A 1 A を被験物質と接触する工程における P L A 1 の基質としては、P L A 1 の基質になり得るグリセロリン脂質であれば特に制限はなく、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトールポリリン酸、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、リゾリン脂質などを挙げることで好適には、ホスファチジルセリンを用いることができる。

P L A 1 A は P L A 1 A の活性を測定できる限りにおいて、どのような状態でも良く、培養上清、部分製製品、精製品を適当に選択して用いることができ、例えば、下記の「6 . 」の項の「(1) 抗原の調製」に記載した方法によって調整することができる。

【0099】

ロ) 被験物質の存在下で基質を加水分解する活性が減少するかどうかを決定する工程における基質を加水分解する活性は、例えば、特開平10-201479に記載の方法によって測定することができる。具体的には公知の方法(J . B i o c h e m . , 101, 1987, p53-61)に従って調製した1-[¹⁴C]パルミトイル-2-アシル-sn-グリセロ-3-フォスフォセリンを基質として、0.4mM塩化カルシウムを含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に4.0mMの基質と酵素をP L A 1 Aを加え37℃で適当な時間反応させた後、Doleの溶液(J . B i o l . C h e m . , V o l . 235, 1960, p.2595-2599)を加えて反応を停止、遊離された脂肪酸を抽出した後、放射能を測定する。

【0100】

このような方法によって測定されたP L A 1 Aの基質を加水分解する活性が、被験物質を添加なかった場合に比べ減少している場合、被験物質がフォスホオリパーゼA1活性を阻害することを示し、そのような被験物質はフォスホオリパーゼA1活性を阻害する物質として同定され、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質であると決定することができる。

【0101】

3 BUCS1

BUCS1のアシル-CoA(Acyl-CoA)の合成活性を阻害する物質を同定することを特徴とし、以下の工程イ)乃至ロ)を含むことからなる、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質の決定方法：

イ) BUCS1の基質とBUCS1を被験物質と接触する工程；

ロ) 被験物質の存在下でアシル-CoAの合成量が減少するかどうかを決定する工程(ここで、アシル-CoAの合成量が減少することは被験物質がBUCS1のアシル-CoAの合成活性を阻害することを示す。)

以下、各工程を更に詳しく説明する。

イ) BUCS1の基質とBUCS1を被験物質と接触する工程における、BUCS1の基質としてはオクタン酸(Octanoate)を用いることができ、BUCS1はBUCS1の活性を測定できる限りにおいて、どのような状態でも良く、培養上清、部分製製品、精製品を適当に選択して用いることができ、例えば、下記の「6 . 」の項の「(1) 抗原の調製」に記載した方法によって調整することができる。

【0102】

ロ) 被験物質の存在下でアシル-CoAの合成量が減少するかどうかを決定する工程における、アシル-CoAの合成量が減少するかどうかは、BUCS1の活性を測定することによって決定することができる。BUCS1の活性測定は例えば、J . B i o l . C h e m . , V o l . 276, 2001, p.35961-35966やJ . B i o l . C h e m . , V o l . 276, 2001, p.11420-11426に記載の方法によってできるBUCS1の活性を測定できる限りにおいて、これらの方法に限定されない。以下に具体例を示す。100mMのTris-HCl, pH8.0, 10mM MgCl₂, 10mM ATP, 1mM CoA, 10mM [¹⁴C]オクタン酸(octanoate)(1000cpm/nmol)に相当量の被験

10

20

30

40

50

物質を添加して全量 0.2 ml にする。オクタン酸は Triton X-100 で最終濃度 1% w/v にしたものを用いる。37 で 1 分間ブレインキュベーションし、BUCS 1 の酵素溶液を添加して酵素反応を開始する。30 分間のインキュベーションの後に 50 µl の 30% のメタリン酸を添加して酵素反応を停止する。酵素反応産物である [¹⁴C] アシル-CoA はクロマトグラフィー・メディア (Chromatography media) (ITLC-SG タイプ、ゲルマン・サイエンス (Gelman Sciences) にスポットし、水飽和エーテル/ギ酸 (7:1) で洗浄し放射活性を測定し、アシル-CoA の合成量を決定する。同様の実験を被験物質を添加しない条件でも行い、アシル-CoA の合成量を決定する。このような方法によって測定された BUCS 1 の活性が被験物質を添加しなかった場合に比べ減少している場合、被験物質が BUCS 1 の活性を阻害することを示し、そのような被験物質は BUCS 1 の活性を阻害する物質として同定され、前立腺癌に対する治療効果及び/または予防効果を有する物質であると決定することができる。

【0103】

(4) その他の方法

TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 の少なくともいずれか一つを過剰発現させた哺乳動物個体に被験物質を投与した場合と投与しなかった場合について、経時的に癌の発生率、癌の大きさ、及び/または生存率等を測定する。被験物質を投与した哺乳動物で癌の発生率が有意に低下している、癌の大きさが有意に小さい、及び/または、生存率が約 10% 以上、好ましくは約 30% 以上、より好ましくは、約 50% 以上上昇した場合に、被験物質は癌に対する治療及び/または予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0104】

6. 抗 TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 抗体の製造

(1) 抗原の調製

抗 TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 抗体のいずれかを作製するための抗原としては、TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかまたはその少なくとも 6 個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

【0105】

前記抗原ポリペプチドは TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかをヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 を *in vitro* にて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかの遺伝子を発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることによって TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかを発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかの cDNA は例えば、TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかを発現している cDNA ライブラリーを鋳型として、TRPM4、PLA1A 及び BUCS 1 のいずれかの cDNA を特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下「PCR」という) [Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照] を行なう、いわゆる PCR 法により取得することができる。

【0106】

ポリペプチドのイン・ビトロ (*in vitro*) 合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティクス社製のラピッドトランスクリプションシステム (RTS) が挙げられるが、これに限定されない。RTS を用いる場合を例に挙げると、目的の遺伝子を T7 プロモーターにより制御される発現ベクターにクローニングし、これを *in vitro* の反応系に添加すると、最初に鋳型 DNA より T7 RNA ポリメラーゼにより mRNA が転写さ

れ、その後大腸菌溶解液中のリボソーム等により翻訳が行われ、目的のポリペプチドが反応液中に合成される (Biochemica, 1, 20-23 (2001), Biochemica, 2, 28-29 (2001))。

【0107】

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

10

【0108】

例えば、大腸菌としては K12 株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、及びベクターがいずれも使用できる。

【0109】

プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リポプロテイン (*lpp*) プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子 Tu (*tufB*) プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

20

【0110】

枯草菌としては、例えば 207-25 株が好ましく、ベクターとしては pTUB228 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の - アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードする DNA 配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0111】

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182、ATCC CRL-1650)、マウス繊維芽細胞 NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) などがよく用いられているが、これらに限定されない。

30

【0112】

脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、サイトメガロウイルス初期プロモーターを有する pcDNA3.1 (インビトロジェン社製)、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864) などが挙げられるが、これに限定されない。

40

【0113】

宿主細胞として、COS 細胞あるいは NIH3T3 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞あるいは NIH3T3 細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、及び RNA スプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは、DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン

50

酸カルシウム - DNA共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* 52, 456 - 457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.* 1, 841 - 845) などによりCOS細胞、あるいはNIH3T3細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) やpSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327 - 341) などをコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、目的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

10

【0114】

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、鱗翅類ヤガ科のSpodoptera frugiperdaの卵巣細胞由来株化細胞 (Sf-9またはSf-21) やTrichoplusia niの卵細胞由来High Five細胞 (Wickham, T. J. et al. (1992) *Biotechnol. Prog.* 1: 391 - 396) などが宿主細胞としてよく用いられ、バキュロウイルスストランスファーベクターとしてはオートグラフィ核多角体ウイルス (AcNPV) のポリヘドリン蛋白質のプロモーターを利用したpVL1392/1393がよく用いられる (Kidd, I. M. and V.C. Emery (1993) *The use of baculoviruses as expression vectors. Applied Biochemistry and Biotechnology* 42, 137 - 159)。この他にも、バキュロウイルスのP10や同塩基性蛋白質のプロモーターを利用したベクターも使用できる。さらに、AcNPVのエンベロープ表面蛋白質GP67の分泌シグナル配列を目的蛋白質のN末端側に繋げることにより、組換え蛋白質を分泌蛋白質として発現させることも可能である (Zhe-mei Wang, et al. (1998) *Biol. Chem.*, 379, 167 - 174)。

20

30

【0115】

真核微生物を宿主細胞とした発現系としては、酵母が一般によく知られており、その中でもサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母Saccharomyces cerevisiaeや石油酵母Pichia pastorisが好ましい。該酵母などの真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター (Benetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3018 - 3025) や酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーター (Miyano-hara, A. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1 - 5) などを好ましく利用できる。また、分泌型蛋白質として発現させる場合には、分泌シグナル配列と宿主細胞の持つ内在性プロテアーゼあるいは既知のプロテアーゼの切断部位をN末端側に持つ組換え体として発現することも可能である。例えば、トリプシン型セリンプロテアーゼのヒトマスト細胞トリプターゼを石油酵母で発現させた系では、N末端側に酵母のファクターの分泌シグナル配列と石油酵母の持つKEX2プロテアーゼの切断部位をつなぎ発現させることにより、活性型トリプターゼが培地中に分泌されることが知られている (Andrew, L. Niles, et al. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 125 - 131)。

40

【0116】

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により

50

細胞内、または細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記COS細胞であれば、RPMI 1640培地やダルベッコ変法イーグル培地（以下「DMEM」という）などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

【0117】

上記培養により、形質転換体の細胞内または細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンを繋げることにより、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。上記方法を組み合わせることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

10

【0118】

(2) 抗TRPM4、PLA1A及びBUCS1モノクローナル抗体の製造TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかと特異的に結合する抗体の例として、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかと特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げる

20

【0119】

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- (a) 抗原として使用する生体高分子の精製、
- (b) 抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- (c) 骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- (d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- (e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- (g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、またはハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- (h) このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその認識特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

30

【0120】

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

【0121】

(a) 抗原の精製
抗原としては、前記したような方法で調製したTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかまたはその一部を使用することができる。また、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを発現する組換え体細胞より調製した膜画分、またはTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを発現する組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

40

【0122】

(b) 抗体産生細胞の調製
工程(a)で得られた抗原と、フロインドの完全または不完全アジュバント、またはカリ

50

ミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A K R 、 B A L B / c 、 B D P 、 B A 、 C E 、 C 3 H 、 5 7 B L 、 C 5 7 B R 、 C 5 7 L 、 D B A 、 F L 、 H T H 、 H T 1 、 L P 、 N Z B 、 N Z W 、 R F 、 R I I I 、 S J L 、 S W R 、 W B 、 1 2 9 等が、またラットの場合には、たとえば、Low 、 Lewis 、 Sprague 、 Daweley 、 A C I 、 B N 、 F i s c h e r 等を用いることができる。これらのマウス及びラットは例えば日本チャールスリバー、日本 S L C 、 The Jackson Laboratories 等実験動物飼育販売業者より入手することができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは B A L B / c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は、好ましくは 5 ~ 12 週齢、さらに好ましくは 6 ~ 8 週齢である。

【0123】

TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかまたはこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。これらの免疫法のうち、この発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。すなわち、まず、抗原である膜蛋白画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内または腹腔内に投与する。ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半または最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数3~6回、投与間隔2~6週間が好ましく、投与回数3~4回、投与間隔2~4週間がさらに好ましい。投与回数を過度に増やすと抗原を浪費し、また投与間隔を広げすぎると動物の老化による細胞の低活性化を招くために好ましくない。また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、0.05~5 ml、好ましくは0.1~0.5 ml程度とする。追加免疫は、以上の通りの抗原投与の1~6週間後、好ましくは2~4週間後、さらに好ましくは2~3週間後に行う。この追加免疫の時期が6週間目より遅すぎたり、1週間目より早すぎると追加免疫の効果が少ない。なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には、0.05~5 ml、好ましくは0.1~0.5 ml、さらに好ましくは0.1~0.2 ml程度とする。不必要の大量投与は免疫効果を低下させるだけでなく、被免疫動物にとっても好ましものではない。

【0124】

上記追加免疫から1~10日後、好ましくは2~5日後、さらに好ましくは2~3日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ球を無菌的に取り出す。なお、その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

【0125】

ここで用いられる抗体価の測定法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、受身

血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法またはELISA法がより好適である。

【0126】

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製または部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中のモノクローナル抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。

10

【0127】

これらの脾臓細胞またはリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法(例えば、Kohler et al., Nature, 256, 495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol., 6, 511, 1977; Milstein et al., Nature, 266, 550, 1977; Walsh, Nature, 266, 495, 1977)に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、細胞を細切してステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地(MEM)に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的な方法を採用することができる。

20

【0128】

(c) 骨髓腫細胞(以下、「ミエローマ」という)の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来のX63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1等、ラット由来の210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3)等、ヒト由来のU266AR(SK0-007)、GM1500.GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。これらのHGPRT欠損株は例えば、American Type Culture Collection(ATCC)等から入手することができる。

30

【0129】

これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清(以下「FCS」という)を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という)、またはダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という)で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地[例えば、10% FCSを含むASF104培地(味の素(株)社製)]で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

40

【0130】

(d) 細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法(Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications

50

, Oxford (1987)、Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等) に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量1500~6000、好ましくは2000~4000のポリエチレングリコール溶液中で、30~40、好ましくは35~38の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1~10分間、好ましくは5~8分間混合する。 10

【0131】

(e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)選択法〔Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975); Milstein et al., Nature 266, 550 (1977)〕が用いられる。この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRト欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞およびハイブリドーマをHAT培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。 20

【0132】

(f) 単一細胞クローンへの分割(クローニング)

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる〔例えばBarbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照〕。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられる。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。この方法では、マイクロプレートにラット胎児由来繊維芽細胞株、あるいは正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞、腹水細胞などのフィーダー(feeder)を接種しておく。一方、あらかじめハイブリドーマを0.2~0.5個/0.2mlになるように培地中で希釈し、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0.1mlずつ入れ、一定期間毎(例えば3日毎)に約1/3の培地を新しいものに交換しながら2週間程度培養を続けることによってハイブリドーマのクローンを増殖させることができる。 30

【0133】

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗TRPM4、抗PLA1A及び抗BUCS1のいずれかのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。 40

【0134】

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

【0135】

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手 50

順により行うことができる。まず、精製または部分精製したTRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つ、もしくはTRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを発現させた細胞をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中の抗TRPM4抗体、抗PLA1A抗体及び抗BUCS1抗体の少なくともいずれか一つを結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。なお、このようなスクリーニングは、上記のようにハイブリドーマをクローニングした後で行なってもよいし、その前に行なってもよい。

10

【0136】

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中または-80以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

【0137】

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス(例えば、上記のBALB/c)、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。腹腔内に投与する場合には、事前(3~7日前)に2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(2,6,10,14-tetramethylpentadecane)(プリスタン)等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。たとえば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を血清を含まない培地中に浮遊(0.5ml)させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水にたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法により、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

20

30

【0138】

上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載されている方法で精製することができる。すなわち、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等である。これらの方法のうち、硫酸塩析法を3~4回、好ましくは3~6回繰り返すことによって、モノクローナル抗体を精製することが可能である。しかしこの方法では精製モノクローナル抗体の収率が極めて低くなる。そのため、硫酸分画法を1~2回行なった粗精製モノクローナル抗体について、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等から選ばれた少なくとも1種類、好ましくは2種類の方法を行なうことによって、高純度に精製されたモノクローナル抗体を高収率で得ることができる。硫酸塩析法と他法との組合せおよび順序としては、1 硫酸塩析法-イオン交換クロマトグラフィー法-ゲル濾過法、2 硫酸塩析法-イオン交換クロマトグラフィー法-アフィニティークロマトグラフィー法、3 硫酸塩析法-ゲル濾過法-アフィニティークロマトグラフィー法等を例示することができるが、高純度でかつ高収率にモノクローナル抗体を得るためには、上記3の組合せが好ましい。

40

【0139】

精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット(例えば、MAbTrap GIIキット;ファルマシア社製)等を利用することもできる。

50

【0140】

かくして得られるモノクローナル抗体は、TRPM4を抗原として用いた場合には、TRPM4に対して、PLA1Aを抗原として用いた場合には、PLA1Aに対して、そしてBUCS1を抗原として用いた場合にはBUCS1に対して高い抗原特異性を有する。

【0141】

(h)モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー(Ouchterlony)法、ELISA法、またはRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法またはRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット(例えば、マウスタイパーキット;バイオラッド社製)等を利用することもできる。

【0142】

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{イムノグロブリン} 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

【0143】

(3)ヒト化抗TRPM4抗体、ヒト化抗PLA1A抗体及びヒト化抗BUCS1抗体の作製

得られた抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、抗原性の問題からヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1抗体を作製することが望ましい。ヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1抗体の作製は、次に述べるような手法により得ることができる。即ち、1 ヒト末梢血あるいは脾臓から採取したヒトリンパ球を*in vitro*でIL-4存在下、抗原であるTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかで感作し、感作したヒトリンパ球をマウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆H₆/B₅(ATCC CRL-1823)と細胞融合させることにより目的の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングする。得られた抗体産生ハイブリドーマが生産する抗体は、ヒトTRPM4に対してはヒト型抗ヒトTRPM4、ヒトPLA1Aに対しては抗ヒトPLA1A及びBUCS1に対しては抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体である。これらの抗体の中からTRPM4、PLA1A及びBUCS1の活性を中和する抗体をそれぞれ選別する。しかしながら、このようにヒトリンパ球を*in vitro*で感作する方法では、一般的に抗原に対して高親和性の抗体を得るのは困難である。従って、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかに高親和性のモノクローナル抗体を得るには、上記のようにして得られた低親和性のヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体を高親和化する必要がある。それには、上記のようにして得られ、中和抗体であるものの低親和性であるヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体のそれぞれのCDR領域(特にCDR-3)にランダム変異を導入し、これをファージで発現させてヒトTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを固相化したプレートを用いてファージディスプレイ法により、抗原であるTRPM4、PLA1A及びBUCS1のそれぞれに強力に結合するファージを選択し、そのファージを大腸菌で増やし、その塩基配列から高親和性を有するCDRのアミノ酸配列を決定すればよい。このようにして得られたヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体をコードする遺伝子を一般的に使用されている哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んで、発現させることによりヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体が得られる。これらの中から、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のそれぞれの生物活性を中和し、かつ高親和性である目的のヒト型抗ヒトTRPM4、抗ヒトP

10

20

30

40

50

LA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体を選別することができる。また、2
 Balb/cマウスを用いて、本発明と同じように常法(Kohler et al.
 : Nature 256, p. 495-497, 1975)によりマウス型抗ヒト
 TRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体を作製し、ヒト
 TRPM4、ヒトPLA1A及びヒトBUCS1のいずれかの生物活性を中和し、かつ高
 親和性を有するモノクローナル抗体を選択する。この高親和性マウス型抗ヒトTRPM4
 、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体のCDR-領域(CDR-
 1、2および3)をヒトIgGのCDR領域に移植するCDR-grafting(Win-
 ter and Milstein: Nature 349, p293-299,
 1991)の手法を駆使することによりヒト型化が可能である。上記に加え、さらに 10
 3 ヒト抹消血リンパ球をSevere combined immune deficiency(SCID)マウスに移植し、この移植されたSCIDマウスはヒト型抗体を
 生産する(Mosier D. E. et al.: Nature 335, p2
 56-259, 1988; Duchosal M. A. et al.: Nat-
 ure 355, p258-262, 1992)ので、TRPM4、PLA1A及び
 BUCS1のいずれかを抗原として感作し、スクリーニングすることにより、TRPM4
 、PAL1A及びBUCS1のいずれかに特異的なヒト型モノクローナル抗体を生産する
 リンパ球をそのマウスから採取することができる。得られたリンパ球を前述のヒト型抗体
 の作製法1と同様に、マウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆H₆/B₅
 (ATCC CRL-1823)と細胞融合させ、得られたハイブリドーマをスクリーニ- 20
 ングすることにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る
 ことができる。このようにして得られたハイブリドーマを培養することにより、目的のヒ
 ト型モノクローナル抗体を大量に製造でき、上述の方法と同様に精製することにより精製
 品を得ることができる。また、目的のヒト型モノクローナル抗体をコードする遺伝子(c
 DNA)をクローニングし、この遺伝子を遺伝子工学的手法により適当なベクターに組み
 込み、各種動物細胞、混注細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現させることにより
 、遺伝子組換えヒト型モノクローナル抗体を大量に製造することができる。得られた培養
 液から上述と同様の方法により精製することにより、精製されたヒト型モノクローナル抗
 体を大量に得ることができる。更に、上述の方法で得られた抗ヒトTRPM4、抗ヒトP
 LA1A及び抗ヒトBUCS1モノクローナル抗体の中から、TRPM4、PLA1A及 30
 びBUCS1のいずれかの生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらTRPM
 4、PLA1A及びBUCS1のいずれかの生物活性を中和する抗体は、生体内でのTR
 PM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかの生物活性、即ち、癌細胞の増殖を阻害す
 ることから、医薬として、特に癌、好適には前立腺癌に対する治療及び/または予防剤と
 して期待される。in vitroでのTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれ
 かの生物活性の中和活性は例えば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを
 過剰発現している細胞における細胞の癌化の抑制活性で測定することができる。例えば、
 TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを過剰発現しているマ
 ウス繊維芽細胞株NIH3T3を培養し、培養系に種々の濃度で過剰発現している蛋白質
 に応じて、抗ヒトTRPM4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1抗体の少なくとも 40
 いずれか一つを添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑
 制活性を測定することができる。in vivoでの実験動物を利用した抗ヒトTRPM
 4、抗ヒトPLA1A及び抗ヒトBUCS1抗体の前立腺癌に対する治療及び/または予
 防効果は、例えば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを
 過剰に発現しているトランスジェニック動物に過剰発現している蛋白質に応じて、抗TR
 PM4、抗PLA1A及び抗BUCS1抗体の少なくともいずれか一つを投与し、癌細胞
 の変化を測定することができる。

【0144】

6. 抗TRPM4モノクローナル抗体、抗PLA1Aモノクローナル抗体及び抗BUCS1モノクローナル抗体を含有する医薬

上述の「5. 抗TRPM4モノクローナル抗体、抗PLA1Aモノクローナル抗体及び抗BUCS1モノクローナル抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗ヒトモノクローナル抗体の中から、TRPM4、PLA1A及び抗BUCS1のそれぞれの生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらTRPM4、PLA1A及び抗BUCS1のそれぞれの生物活性を中和する抗体は、生体内でのTRPM4、PLA1A及び抗BUCS1のそれぞれの生物活性、即ち、細胞の癌化を阻害することから、医薬として、特に癌に対する治療及び/または予防剤として期待される。*in vitro*での抗TRPM4抗体、抗PLA1A抗体及び抗BUCS1抗体のそれぞれの生物活性の中和活性は例えば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを過剰発現している細胞における細胞の癌化の抑制活性で測定することができる。例えば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つを過剰発現しているマウス繊維芽細胞株NIH3T3を培養し、培養系に種々の濃度で抗TRPM4抗体、抗PLA1A抗体及び抗BUCS1抗体の少なくともいずれか一つを添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。*in vivo*での実験動物を利用した抗TRPM4抗体、抗PLA1A抗体及び抗BUCS1抗体のそれぞれの前立腺癌に対する治療及び/または予防効果は、例えば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを過剰に発現しているトランスジェニック動物に過剰に発現している蛋白質に対する抗体を投与し、癌細胞の変化を測定することができる。

10

【0145】

このようにして得られたTRPM4、PLA1A及びBUCS1から選択されるいずれかの生物活性を中和する抗体は、医薬として特に癌の治療及び/または予防を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。

20

【0146】

本発明の抗体はドキソルピシン、エビルピシン、ダウノルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、イリノテカン、トポテカン、9-カンプトテシン、シスプラチン、AraC、5FU、ネオカルチノシタチン、抗HER2抗体、TRA8、TRA1L等の抗癌活性を有する物質と併用して用いることもできる。併用する場合は、同時に投与しても良いし、別個に投与しても良い。本発明の抗体は製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。本発明の抗体を含む製剤は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを認識する抗体を有効成分として含有する医薬組成物として、ヒトあるいは動物に対し安全に投与されるものである。また、製剤は、ドキソルピシン、エビルピシン、ダウノルピシン、パクリタキセル、ドセタキセル、イリノテカン、トポテカン、9-カンプトテシン、シスプラチン、AraC、5FU、ネオカルチノシタチン、抗HER2抗体、TRA8、TRA1L等の抗癌活性を有する物質も含有する製剤でも良い。医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。モノクローナル抗体は高分子蛋白質であることから、バイアル瓶などのガラス容器や注射筒などへの吸着が著しい上に不安定であり、種々の物理化学的因子、例えば、熱、pH及び湿度等により容易に失活する。従って、安定な形で製剤化するために、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤などを添加する。安定化剤としてはグリシン、アラニン等のアミノ酸類、デキストラン40及びマンノース等の糖類、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等の糖アルコール等が挙げられ、またこれらの二種以上を併用してもよい。これらの安定化剤の添加量は、抗体の重量にたいして0.01~100倍、特に0.1~10倍添加するのが好ましい。これら安定化剤を加えることにより、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の保存安定性を向上することができる。緩衝剤としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水溶液のpHを調製し、抗体の安定性、溶解性に寄与する。緩衝剤の添加量としては、例えば液状製剤あるいは凍結乾燥製剤を採用した後の水量に対し、1~10mMとするのが好ましい。界面活性剤としては、好ましくはポリソルベート20、ブルコニックF-68、ポリエチレングリコール等、特に好ましくはポリソルベート80

30

40

50

が挙げられ、またこれらの2種以上を併用してもよい。界面活性剤の添加量としては、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水重量に対して0.001~1.0%添加することが好ましい。以上のような安定化剤、緩衝剤、あるいは吸着防止剤を加えて本発明抗体の製剤を調製することができるが、特に医療用または動物用注射剤として用いる場合は、浸透圧として許容される浸透圧比は1~2が好ましい。浸透圧比は、製剤化に際して塩化ナトリウムの増減により調製することができる。製剤中の抗体含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができ、ヒトに対するヒト型抗体の投与量は、それぞれの抗体のTRPM4、PLA1A及びBUCS1に対する親和性、即ち、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のそれぞれに対する解離定数(Kd値)に対し、親和性が高い(Kd値が低い)ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発揮することができる。ヒト型抗TRPM4抗体、ヒト型抗PLA1A抗体及びヒト型抗BUCS1抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~30日間に1回投与すればよい。

10

【0147】

7. 直接相互作用する物質の探索

本発明の他の一つの態様としては、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つの活動を抑制するような物質を得ることを目的とした、該蛋白質の立体構造をベースとしたドラッグデザインの手法を含む。このような手法は、ラショナルドラッグデザイン法として知られており、酵素活性などの機能や、リガンド、コファクター、またはDNAへの結合などを効率よく阻害もしくは活性化させるような化合物の探索に利用されている。この例として、すでに上市されている抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤がよく知られている。TRPM4、PLA1A及びBUCS1の三次元構造解析においても、X線結晶解析や核磁気共鳴法といった一般的によく知られている手法が利用できると考えられる。さらに、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の機能を抑制する物質の探索には、コンピュータドラッグデザイン(CADD)を活用した設計も可能である。この例としては、慢性関節リウマチ治療の新たなゲノム新薬として期待されているAP-1の働きを阻害する低分子化合物(国際特許出願公開WO99/58515号)などが知られている。このような方法により、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つに直接結合したり、あるいはTRPM4、PLA1A及びBUCS1の少なくともいずれか一つと他の因子との相互作用を阻害することにより、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の機能を抑制するような物質を得ることができる。

20

30

【0148】

さらに、他の一つの態様は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかが会合するポリペプチド、すなわち、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかのパートナー蛋白質に関する。すなわち、本発明は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1の活性を調節するパートナー蛋白質のスクリーニング方法に関する。

【0149】

このスクリーニング方法の一つの態様は、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかに被験蛋白質試料を接触させ、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかに結合する蛋白質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、精製したTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかを用いて、これに結合する蛋白質のアフィニティー精製を行う方法が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、TRPM4、PLA1A及びBUCS1にヒスチジン6個よりなる配列をアフィニティータグとして融合したものを作製して、これを細胞の抽出液(予めニッケル-アガロースカラムにチャージして、このカラムを素通りした画分)と4で12時間インキュベートし、次いで、この混合物に別途ニッケル-アガロース担体を加えて4で1時間インキュベートする。ニッケル-アガロース担体を洗浄バッファーで十分洗浄した後、100mMイミダゾールを加えることにより、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかと特異的に結合する細胞抽出液中の蛋白質を溶出させて精製し、この構造を決定する。このようにして、TRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかと直接結合する蛋白質、及びTRPM4、PLA1A及びBUCS1のいずれかとの結合活性は持たないが、サブユニットとしてTR

40

50

P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかに直接結合する蛋白質と複合体を形成することにより間接的に T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかに結合する蛋白質が精製できる [実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ 5 「転写因子研究法」 p p 2 1 5 - 2 1 9 (羊土社刊)]。

【 0 1 5 0 】

別の方法としては、ファーウエスタンブロット法 [実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」 p p 7 6 - 8 1 (羊土社刊)] や、酵母や哺乳類動物細胞を用いたツーハイブリッドシステム法 [実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」 p p 6 6 - 7 5 (羊土社刊)、「チェックメイト・マンマリアン・ツーハイブリッドシステム」(プロメガ社製)] によるクローニングも可能であるが、これらの方法に限定されない。

10

【 0 1 5 1 】

このようにして、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかと直接もしくは間接的に相互作用するパートナー蛋白質の c D N A が得られれば、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかと該パートナー蛋白質との相互作用を阻害する物質の機能的スクリーニングに利用することができる。具体的には、例えば、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかとグルタチオン S - トランスフェラーゼとの融合蛋白質を調製して、抗グルタチオン S - トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレートに結合させた後、ビオチン化した該パートナー蛋白質をこの融合蛋白質と接触させ、該融合蛋白質との結合をストレプトアビジン化アルカリフォスファターゼで検出する。ビオチン化した該パートナー蛋白質添加の際、被験物質も添加し、融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合を促進あるいは阻害する物質を選択する。この方法では、融合蛋白質に直接作用する物質または該パートナー蛋白質に直接作用する物質が得られる。

20

【 0 1 5 2 】

融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合が間接的であり、何らかの別の因子を介しているような場合には、例えば該因子を含むような細胞抽出液存在下で、同様に上記アッセイを行う。この場合には、該因子に対して作用するような物質も選択される可能性がある。

【 0 1 5 3 】

また、得られたパートナー蛋白質が、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかの機能を抑制する活性を有している場合には、既に記載した T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかの遺伝子の発現ベクターを応用した試験方法に従って、抗癌剤、例えば、前立腺癌の治療または予防剤として有用な候補物質のスクリーニングを行うことができる。また、得られたパートナー蛋白質が、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 のいずれかの機能を抑制する活性を有している場合には、このような抑制因子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、前立腺癌の遺伝子治療に用いることができる。

30

【 0 1 5 4 】

そのようなポリヌクレオチドは、例えば同定された阻害因子のアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成して c D N A ライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、T R P M 4、P L A 1 A 及び B U C S 1 の少なくともいずれか一つの機能の阻害活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなる D N A を化学合成する。

40

【 0 1 5 5 】

遺伝子治療においては、そのようにして得られた阻害因子をコードする遺伝子を、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス(無毒化されたもの)を患者に感染させる。患者体内では抗癌因子が産生され、癌細胞の増殖抑制機能を有するので、前立腺癌の治療が可能となる。

【 0 1 5 6 】

遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入

50

方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、実験医学増刊，12（15）（1994）、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」，羊土社（1996））のいずれの方法も適用することができる。

【0157】

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクシン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

10

【0158】

また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（*in vivo*）法及びヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボ（*ex vivo*）法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20 - 45頁、月刊薬事，36（1），23 - 48（1994）、実験医学増刊，12（15）（1994））。

【0159】

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス・リポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

20

【0160】

配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1、3、5、7及び9から選択される少なくとも一つに示されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列または該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号1、3、5、7及び9からなる群から選択される少なくとも一つに示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常15乃至30merからなるDNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはモルフォリノ誘導体などの安定なDNA誘導体、2'-O-アルキルRNAなどの安定なRNA誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リポソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列がコードする蛋白質の活性が増加しすぎることによって引き起こされる病気の治療または予防に有用である。

30

【0161】

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、Applied Antisense Oligonucleotide Technology（1998 Wiley-Liss, Inc.）に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む製剤は、それ自体あるいは適宜の薬理的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等により経口的に、または、注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは、外用剤等により非経口的に投与することができる。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；

40

50

アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤を挙げることができる。）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

10

20

【0162】

本発明の化合物を患者へ導入する方法については、上記に加えてコロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織または細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば限定しないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げる事ができ、好ましくは、特定の臓器、組織または細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である（Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698）。

30

40

【0163】

0.2 - 0.4 μm のサイズ範囲をとる単膜リポソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化し得、化合物はこの水性内膜に被胞化され、生物学的に活性な形態で脳細胞へ輸送される（Fraleigh et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, 77）。リポソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質、とりわけ相転移温度の高いリン脂質を1種またはそれ以上のステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リポソーム生産に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物を包含する。特に有用なのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここ

50

では脂質部分が14 - 18の炭素原子、特に16 - 18の炭素原子を含有し、飽和している(14 - 18の炭素原子鎖の内部に二重結合を欠いている)。代表的なリン脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンを包含する。

【0164】

リポソームを包含するコロイド分散系の標的化は、受動的または能動的のいずれかであってもよい。受動的な標的化は、洞様毛細血管を含有する臓器の網内系細胞へ分布しようとするリポソーム本来の傾向を利用することによって達成される。一方、能動的な標的化は、例えば、ウイルスの蛋白質コート(Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 1993, 90, 8474)、モノクローナル抗体(またはその適切な結合部分)、糖、糖脂質または蛋白質(またはその適切なオリゴペプチドフラグメント)のような特定のリガンドをリポソームへ結合させること、または天然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞型への分布を達成するためにリポソームの組成を変えることによってリポソームを修飾する手法等を挙げる事ができる。標的化されたコロイド分散系の表面は様々なやり方で修飾され得る。リポソームで標的したデリバリーシステムでは、脂質二重層との緊密な会合において標的リガンドを維持するために、リポソームの脂質二重層へ脂質基が取込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドと結びつけるために様々な連結基が使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドのデリバリーが所望される細胞の上に支配的に見出される特定の細胞表面分子に結合する標的リガンドは、例えば、(1)デリバリーが所望される細胞によって支配的に発現される特定の細胞受容体と結合している、ホルモン、成長因子またはその適切なオリゴペプチドフラグメント、または(2)標的細胞上で支配的に見出される抗原性エピトープと特異的に結合する、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその適切なフラグメント(例えば、Fab; F(ab')₂)、であり得る。2種またはそれ以上の生物活性剤は、単一のリポソーム内部で複合し、投与することもできる。内容物の細胞内安定性及び/または標的化を高める薬剤をコロイド分散系へ追加することも可能である。

10

20

【0165】

その使用量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当たり下限1mg(好適には、30mg)、上限2000mg(好適には、1500mg)を、注射の場合には、1回当たり下限0.1mg(好適には、5mg)、上限1000mg(好適には、500mg)を皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

30

【0166】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

40

【0167】

実施例1 ヒトTRPM4の発現プロファイル解析

配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列と部分的に重複するヌクレオチド配列を有するESTプローブ(Affymetrix GeneChip HG-U133 probe 219360_s_at:アフィメトリックス社製)について、GeneLogic社製のデータベース(GeneExpress Software System Release 1.4.2)を用いて発現プロファイル解析を行なった。

【0168】

まず、前立腺由来・正常組織サンプル54例と前立腺由来・腫瘍サンプル87例について遺伝子発現量を比較したところ、前立腺由来・腫瘍サンプルにおいて有意に高く転写され

50

ていた (P 値 < 0 . 0 0 0 1 : 図 1) 。

【 0 1 6 9 】

次に、該データベースにおける前立腺由来・正常組織サンプル 5 4 例と前立腺以外の正常組織サンプル群 (脂肪組織サンプル 3 7 例、骨サンプル 8 例、乳房サンプル 7 4 例、心臓サンプル 5 2 2 例、腎臓サンプル 9 9 例、肝臓サンプル 6 1 例、肺サンプル 1 2 2 例、リンパ節サンプル 1 3 例、筋肉サンプル 4 2 例、卵巣サンプル 9 6 例、膵臓サンプル 4 6 例、胎盤サンプル 8 例、皮膚サンプル 6 6 例、脾臓サンプル 4 1 例、胸腺サンプル 7 0 例、甲状腺サンプル 2 7 例、子宮サンプル 5 9 例) について T R P M 4 の遺伝子発現量を比較したところ、前立腺以外の正常組織サンプル群において有意に低く抑えられていた (乳房サンプルでの P 値 = 0 . 0 0 0 2、胎盤サンプルでの P 値 = 0 . 0 0 3 5、それ以外の臓器サンプルでの P 値 < 0 . 0 0 0 1 : 図 2) 。

10

【 0 1 7 0 】

実施例 2 ヒト P L A 1 A の発現プロファイル解析

配列表の配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列と部分的に重複するヌクレオチド配列を有する EST プロブ (Affymetrix GeneChip HG - U 1 3 3 probe 2 1 9 5 8 4 _at : アフィメトリックス社製) について、GeneLogic 社製のデータベース (GeneExpress Software System Release 1 . 4 . 2) を用いて発現プロファイル解析を行なった。

【 0 1 7 1 】

まず、前立腺由来・正常組織サンプル 5 4 例と前立腺由来・腫瘍サンプル 8 7 例について遺伝子発現量を比較したところ、前立腺由来・腫瘍サンプルにおいて有意に高く転写されていた (P 値 < 0 . 0 0 0 1 : 図 3) 。

20

【 0 1 7 2 】

次に、該データベースにおける前立腺由来・正常組織サンプル 5 4 例と前立腺以外の正常組織サンプル群 (脂肪組織サンプル 3 7 例、乳房サンプル 7 4 例、大腸サンプル 2 2 1 例、十二指腸サンプル 8 2 例、胆のうサンプル 8 例、心臓サンプル 5 2 2 例、卵巣サンプル 9 6 例、直腸サンプル 4 9 例、皮膚サンプル 6 6 例、小腸サンプル 9 5 例、脾臓サンプル 4 1 例、胸腺サンプル 7 0 例、甲状腺サンプル 2 7 例) について P L A 1 A の遺伝子発現量を比較したところ、前立腺以外の正常組織サンプル群において有意に低く抑えられていた (脂肪組織サンプルでの P 値 = 0 . 0 0 0 3、胆のうサンプルでの P 値 = 0 . 0 0 4 1、甲状腺サンプルでの P 値 = 0 . 0 1 2 7、それ以外の臓器サンプルでの P 値 < 0 . 0 0 0 1 : 図 4) 。

30

【 0 1 7 3 】

実施例 3 ヒト B U C S 1 の発現プロファイル解析

配列表の配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列と部分的に重複するヌクレオチド配列を有する EST プロブ (Affymetrix GeneChip HG - U 1 3 3 probe 2 1 5 4 3 2 _at : アフィメトリックス社製) について、GeneLogic 社製のデータベース (GeneExpress Software System Release 1 . 4 . 2) を用いて発現プロファイル解析を行なった。

【 0 1 7 4 】

まず、前立腺由来・正常組織サンプル 5 4 例と前立腺由来・腫瘍サンプル 8 7 例について転写量を比較したところ、前立腺由来・腫瘍サンプルにおいて有意に高く転写されていた (P 値 < 0 . 0 0 0 1 : 図 5) 。

40

【 0 1 7 5 】

次に、該データベースにおける前立腺由来・正常組織サンプル 5 4 例と前立腺以外の正常組織サンプル群 (脂肪組織サンプル 3 7 例、大腸サンプル 2 2 1 例、十二指腸サンプル 8 2 例、腎臓サンプル 9 9 例、肺サンプル 1 2 2 例、直腸サンプル 4 9 例、小腸サンプル 9 5 例、胸腺サンプル 7 0 例、甲状腺サンプル 2 7 例) について B U C S 1 の遺伝子発現量を比較したところ、前立腺以外の正常組織サンプル群において有意に低く抑えられていた (P 値は順に、0 . 0 2 7、0 . 0 0 9 1、0 . 0 0 5 3、0 . 0 2 8 8、0 . 0 0 0 6

50

、0.0022、0.0056、0.0009、0.0441：図6）。

【0176】

実施例4 ヒト前立腺癌細胞株LNCaPおよびPC-3の*siRNA*による増殖抑制

(1) 細胞株とその継代培養

ヒト前立腺癌細胞株LNCaP (American Tissue Culture Collection ATCC No. : CRL-1740) あるいはヒト前立腺癌細胞株PC-3 (American Tissue Culture Collection ATCC No. : CRL-1435) を10%牛胎児血清 (FCS : Hyclone社製) を含むRPMI 1640培地 (旭テクノグラス社製) を用いて、75 cm² の組織培養フラスコ (住友ベークライト社製 : MS-23250) 中でコンフルエント (confluent) にならないよう注意しつつ5% CO₂ , 37 条件下で培養し、対数増殖期のうちにトリプシン-EDTA溶液 (シグマ社製) を用いて新しい組織培養フラスコに移して継代培養した。 10

【0177】

(2) ヒト前立腺癌細胞株LNCaPおよびPC-3の*siRNA*による増殖抑制試験および遺伝子発現抑制試験

ポリD-リジンコートされた組織培養24穴シャーレ (Poly-D-Lysine Cellware 24-Well Plate : ベクトンディッキンソン社製) にヒト前立腺癌細胞株LNCaPあるいはPC-3を4 x 10⁴ 個ずつまき、0.4 mlの10% FCS含有RPMI 1640培地中で一晚培養した。培養上清を0.4 mlのRPMI 1640培地に交換した後、さらにいずれかの遺伝子に相同な*siRNA*、200 nMおよび1.2% DMRIE-C Reagent (インビトロジェン社) を含む0.2 mlのRPMI 1640培地に交換し4時間培養することで*siRNA*を細胞に導入した。ここで、TRPM4用の*siRNA*のヌクレオチド配列は配列表の配列番号1のヌクレオチド番号330乃至348に相同であり、配列表の以下の配列： 20

5' - GCACAGCAAUUCCUCCGGATT - 3' (配列表の配列番号11) 及び、

5' - UCCGGAGGA A A UUGCUGUGCTT - 3' (配列表の配列番号12) の組み合わせからなり、

PLA1A用の*siRNA*のヌクレオチド配列は配列表の配列番号7のヌクレオチド番号132乃至150に相同であり、以下の配列： 30

5' - AGUGCGCUGACUCCAGAGTT - 3' (配列表の配列番号13)

5' - CUCUGGAAGUCAGCGCACUTT - 3' (配列表の配列番号14) の組み合わせからなり、BUCS1用の*siRNA*のヌクレオチド配列は配列表の配列番号9のヌクレオチド番号623乃至641に相同であり、以下の配列：

5' - GCUCCUGGUGUCUGAUCACTT - 3' (配列表の配列番号15)

5' - GUGAUCAGACACCAGGAGCTT - 3' (配列表の配列番号16) の組み合わせからなる。

【0178】

培養液を新鮮な0.4 mlの10% FCS含有RPMI 1640培地に交換し、一晚培養した。トリプシン-EDTA溶液 (シグマ社製) を用いて細胞を回収し、2 mlの10% FCS含有RPMI 1640培地に懸濁後、96ウェルプレート (コーニングコースター社製カタログ番号3598あるいは3917) に0.1 mlずつ分注し5% CO₂、37 条件下で培養した。*siRNA*を細胞に導入24時間後及び6日後にCell Titer - GloTM Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ株式会社製) を添付のプロトコールに従い用いて細胞内ATPを測定した。ネガティブコントロールとしてヒトには存在しないルシフェラーゼ遺伝子に対する*siRNA*、ポジティブコントロールとしてヒトの必須遺伝子であるEg5遺伝子に対する*siRNA*を用いた。 40

【0179】

ルシフェラーゼ用の *siRNA* のヌクレオチド配列は以下の配列：

5' - CGUACGCGGAUAUCUUCGATT - 3' (配列表の配列番号17)、
5' - UCGAAGUAUUCGCGUACGTT - 3' (配列表の配列番号18) の
組み合わせからなる。

また、ヒト *Eg5* に対する *siRNA* のヌクレオチド配列は以下の配列：

5' - CUGGAUCGUAAGAAGGCAGTT - 3' (配列表の配列番号19)、
5' - CUGCCUUCUUAACGAUCCAGTT - 3' (配列表の配列番号20) の
組み合わせからなる。

【0180】

siRNA を細胞に導入した2日後に *RNeasy 96 Kit (4)* (キアゲン社製) を添付の
10
プロトコールに従い用いて細胞内全 *RNA* を抽出した。得られた全 *RNA* を
OmniScript RT Kit (50) (キアゲン社製) を添付のプロトコールに従
い用いて *cDNA* を合成した。得られた *cDNA* を *Quantitect SYBR Green PCR Kit - for quantitative real-time PCR and two-step RT-PCR* (キアゲン社製) を添付の
プロトコールに従い用いて対象遺伝子の発現量を測定した。この発現量の測定には対象遺伝子内部配
列を特異的に増幅することができるオリゴヌクレオチド *DNA* を用いた。

TRPM4 増幅用の *RT-PCR* プライマーは、以下の配列：

5' - TTCTCGCCTTCTTTTGCCCTCCACTC - 3' (プライマー1：
配列表の配列番号21)、
20

5' - ACACTATCCATGTCAAACTCTAGCTCCTCC - 3' (プライ
マー2：配列表の配列番号22) からなり、

PLA1A 増幅用の *RT-PCR* プライマーは、以下の配列：

5' - ACCCCACAATGCCAGATAAACCAAG - 3' (プライマー3：配
列表の配列番号23)、

5' - TTCAGGTCACAGGAACAGTCACAC - 3' (プライマー4：配
列表の配列番号24) からなり、

BUCS1 増幅用の *RT-PCR* プライマーは、以下の配列：

5' - ACA AATCCTTCCACAACATCC - 3' (プライマー5：配列表の配
列番号25)、
30

5' - CCATTCA C C C A C C A A A A A G C - 3' (プライマー6：配列表の配
列番号26) からなる。

【0181】

また、ヒト前立腺癌細胞株 *LNCaP* についての結果を表1にまとめた。

【0182】

【表1】

LNCaP細胞増殖率(*siRNA*導入6日後)と遺伝子発現量(*siRNA*導入2日後)

標的遺伝子名	細胞増殖率	SD.	遺伝子発現量
LUC	100%	±16%	100%
Eg5	30%	±10%	N.D.
TRPM4	72%	±10%	25%
PLA1A	52%	±7%	36%
BUCS1	72%	±13%	0%

40

【0183】

ルシフェラーゼ遺伝子配列に対応する *siRNA* をヒト前立腺癌細胞株 *LNCaP* に導入
後1~6日目までの5日間での細胞増殖率を100%とした場合、ポジティブコントロー
ルとしてヒトの必須遺伝子である *Eg5* 遺伝子配列に対する *siRNA*、*TRPM4*、*P*
50

L A 1 A および B U C S 1 遺伝子配列に対応する s i R N A を用いるとそれぞれ 3 0 % ± 1 0 %、7 2 % ± 1 0 %、5 2 % ± 7 %、7 2 % ± 1 3 % (平均 ± 標準偏差 (S D)) に細胞増殖率が低下した。s i R N A 導入 2 日後に実施した遺伝子発現量の測定では、ルシフェラーゼ遺伝子配列に対応する s i R N A を導入した場合の遺伝子発現量を 1 0 0 % とした場合、対象遺伝子 T R P M 4、P L A 1 A および B U C S 1 の発現量は、それぞれ 2 5 %、3 6 %、0 % に抑制されていることが示された。対象遺伝子 T R P M 4、P L A 1 A および B U C S 1 の発現を抑制することでヒト前立腺癌細胞株 L N C a P の増殖が抑制されることが示唆された。

【 0 1 8 4 】

ヒト前立腺癌細胞 P C - 3 についての結果を表 2 にまとめた。

10

【 0 1 8 5 】

【 表 2 】

PC-3細胞増殖率(siRNA導入6日後)と遺伝子発現量(siRNA導入2日後)

標的遺伝子名	PC-3	SD.	遺伝子発現量
LUC	100% ± 3%		100%
Eg5	31% ± 2%		N.D.
TRPM4	71% ± 10%		67%
PLA1A	74% ± 8%		51%
BUCS1	85% ± 10%		0%

20

【 0 1 8 6 】

ルシフェラーゼ遺伝子配列に対応する s i R N A をヒト前立腺癌細胞株 P C - 3 に導入後の 1 ~ 6 日目の 5 日間での細胞増殖率を 1 0 0 % とした場合、T R P M 4、P L A 1 A および B U C S 1 遺伝子配列に対応する s i R N A を用いるとそれぞれ 7 1 % ± 1 0 %、7 4 % ± 8 %、8 5 % ± 1 0 % に細胞増殖率が低下した。s i R N A 導入 2 日後に実施した遺伝子発現量の測定では、ルシフェラーゼ遺伝子配列に対応する s i R N A、L U C を導入した場合の遺伝子発現量を 1 0 0 % とした場合、対象遺伝子 T R P M 4、P L A 1 A および B U C S 1 の発現量は、それぞれ 6 7 %、5 1 %、0 % に抑制されていることが示された。対象遺伝子 T R P M 4、P L A 1 A および B U C S 1 の発現を抑制することでヒト前立腺癌細胞株 P C - 3 の増殖が抑制されることが示唆された。

30

【 0 1 8 7 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 1 1 : T R P M 4 に対する s i R N A センスストランド ;
 配列番号 1 2 : T R P M 4 に対する s i R N A アンチセンスストランド ;
 配列番号 1 3 : P L A 1 A に対する s i R N A センスストランド ;
 配列番号 1 4 : P L A 1 A に対する s i R N A アンチセンスストランド ;
 配列番号 1 5 : B U C S 1 に対する s i R N A センスストランド ;
 配列番号 1 6 : B U C S 1 に対する s i R N A アンチセンスストランド ;
 配列番号 1 7 : ルシフェラーゼに対する s i R N A センスストランド ;
 配列番号 1 8 : ルシフェラーゼに対する s i R N A アンチセンスストランド ;
 配列番号 1 9 : E g 5 に対する s i R N A センスストランド ;
 配列番号 2 0 : E g 5 に対する s i R N A アンチセンスストランド ;
 配列番号 2 1 : T R P M 4 に対する R T - P C R 用センスプライマー ;
 配列番号 2 2 : T R P M 4 に対する R T - P C R 用アンチセンスプライマー ;
 配列番号 2 3 : P L A 1 A に対する R T - P C R 用センスプライマー ;
 配列番号 2 4 : P L A 1 A に対する R T - P C R 用アンチセンスプライマー ;
 配列番号 2 5 : B U C S 1 に対する R T - P C R 用センスプライマー ;
 配列番号 2 6 : B U C S 1 に対する R T - P C R 用アンチセンスプライマー。

40

【 0 1 8 8 】

【 配列表 】

50

SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Prostate Cancer Gene

<130> 2003039SU

10

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 4061

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

30

<221> CDS

<222> (73)..(3714)

<223> Inventor: Fukuchi, Keisuke; Agatsuma Toshinori; Hirai Takehiro

<400> 1

ggctcggaaag cagagccggc ggagggagcg ccggggccct gggctgcagg aggttcggc 60

40

ggccgcggca gc atg gtg gtg ccg gag aag gag cag agc tgg atc ccc aag 111

Met Val Val Pro Glu Lys Glu Gln Ser Trp Ile Pro Lys

1

5

10

atc ttc aag aag aag acc tgc acg acg ttc ata gtt gac tcc aca gat 159

Ile Phe Lys Lys Lys Thr Cys Thr Thr Phe Ile Val Asp Ser Thr Asp

15

20

25

ccg gga ggg acc ttg tgc cag tgt ggg cgc ccc cgg acc gcc cac ccc 207

Pro Gly Gly Thr Leu Cys Gln Cys Gly Arg Pro Arg Thr Ala His Pro

30

35

40

45

10

gca gtg gcc atg gag gat gcc ttc ggg gca gcc gtg gtg acc gtg tgg 255

Ala Val Ala Met Glu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Val Val Thr Val Trp

50

55

60

20

gac agc gat gca cac acc acg gag aag ccc acc gat gcc tac gga gag 303

Asp Ser Asp Ala His Thr Thr Glu Lys Pro Thr Asp Ala Tyr Gly Glu

65

70

75

ctg gac ttc acg ggg gcc ggc cgc aag cac agc aat ttc ctc cgg ctc 351

Leu Asp Phe Thr Gly Ala Gly Arg Lys His Ser Asn Phe Leu Arg Leu

80

85

90

30

tct gac cga acg gat cca gct gca gtt tat agt ctg gtc aca cgc aca 399

Ser Asp Arg Thr Asp Pro Ala Ala Val Tyr Ser Leu Val Thr Arg Thr

95

100

105

tgg ggc ttc cgt gcc ccg aac ctg gtg gtg tca gtg ctg ggg gga tcg 447

Trp Gly Phe Arg Ala Pro Asn Leu Val Val Ser Val Leu Gly Gly Ser

40

110	115	120	125	
ggg ggc ccc gtc ctc cag acc tgg ctg cag gac ctg ctg cgt cgt ggg	495			
Gly Gly Pro Val Leu Gln Thr Trp Leu Gln Asp Leu Leu Arg Arg Gly				
130	135	140		
ctg gtg cgg gct gcc cag agc aca gga gcc tgg att gtc act ggg ggt	543			10
Leu Val Arg Ala Ala Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Val Thr Gly Gly				
145	150	155		
ctg cac acg ggc atc ggc cgg cat gtt ggt gtg gct gta cgg gac cat	591			
Leu His Thr Gly Ile Gly Arg His Val Gly Val Ala Val Arg Asp His				
160	165	170		20
cag atg gcc agc act ggg ggc acc aag gtg gtg gcc atg ggt gtg gcc	639			
Gln Met Ala Ser Thr Gly Gly Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala				
175	180	185		
ccc tgg ggt gtg gtc cgg aat aga gac acc ctc atc aac ccc aag ggc	687			
Pro Trp Gly Val Val Arg Asn Arg Asp Thr Leu Ile Asn Pro Lys Gly				
190	195	200	205	30
tcg ttc cct gcg agg tac cgg tgg cgc ggt gac ccg gag gac ggg gtc	735			
Ser Phe Pro Ala Arg Tyr Arg Trp Arg Gly Asp Pro Glu Asp Gly Val				
210	215	220		
cag ttt ccc ctg gac tac aac tac tcg gcc ttc ttc ctg gtg gac gac	783			
Gln Phe Pro Leu Asp Tyr Asn Tyr Ser Ala Phe Phe Leu Val Asp Asp				40
225	230	235		

ggc aca cac ggc tgc ctg ggg ggc gag aac cgc ttc cgc ttg cgc ctg	831	
Gly Thr His Gly Cys Leu Gly Gly Glu Asn Arg Phe Arg Leu Arg Leu		
240 245 250		
gag tcc tac atc tca cag cag aag acg ggc gtg gga ggg act gga att	879	
Glu Ser Tyr Ile Ser Gln Gln Lys Thr Gly Val Gly Gly Thr Gly Ile		10
255 260 265		
gac atc cct gtc ctg ctc ctc ctg att gat ggt gat gag aag atg ttg	927	
Asp Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Gly Asp Glu Lys Met Leu		
270 275 280 285		
acg cga ata gag aac gcc acc cag gct cag ctc cca tgt ctc ctc gtg	975	20
Thr Arg Ile Glu Asn Ala Thr Gln Ala Gln Leu Pro Cys Leu Leu Val		
290 295 300		
gct ggc tca ggg gga gct gcg gac tgc ctg gcg gag acc ctg gaa gac	1023	
Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala Asp Cys Leu Ala Glu Thr Leu Glu Asp		
305 310 315		30
act ctg gcc cca ggg agt ggg gga gcc agg caa ggc gaa gcc cga gat	1071	
Thr Leu Ala Pro Gly Ser Gly Gly Ala Arg Gln Gly Glu Ala Arg Asp		
320 325 330		
cga atc agg cgt ttc ttt ccc aaa ggg gac ctt gag gtc ctg cag gcc	1119	
Arg Ile Arg Arg Phe Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu Val Leu Gln Ala		
335 340 345		40

cag gtg gag agg att atg acc cgg aag gag ctc ctg aca gtc tat tct 1167
 Gln Val Glu Arg Ile Met Thr Arg Lys Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ser
 350 355 360 365

tct gag gat ggg tct gag gaa ttc gag acc ata gtt ttg aag gcc ctt 1215
 Ser Glu Asp Gly Ser Glu Glu Phe Glu Thr Ile Val Leu Lys Ala Leu
 370 375 380

10

gtg aag gcc tgt ggg agc tcg gag gcc tca gcc tac ctg gat gag ctg 1263
 Val Lys Ala Cys Gly Ser Ser Glu Ala Ser Ala Tyr Leu Asp Glu Leu
 385 390 395

cgt ttg gct gtg gct tgg aac cgc gtg gac att gcc cag agt gaa ctc 1311
 Arg Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg Val Asp Ile Ala Gln Ser Glu Leu
 400 405 410

20

ttt cgg ggg gac atc caa tgg cgg tcc ttc cat ctc gaa gct tcc ctc 1359
 Phe Arg Gly Asp Ile Gln Trp Arg Ser Phe His Leu Glu Ala Ser Leu
 415 420 425

atg gac gcc ctg ctg aat gac cgg cct gag ttc gtg cgc ttg ctc att 1407
 Met Asp Ala Leu Leu Asn Asp Arg Pro Glu Phe Val Arg Leu Leu Ile
 430 435 440 445

30

tcc cac ggc ctc agc ctg ggc cac ttc ctg acc ccg atg cgc ctg gcc 1455
 Ser His Gly Leu Ser Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala
 450 455 460

40

caa ctc tac agc gcg gcg ccc tcc aac tcg ctc atc cgc aac ctt ttg 1503

Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu
 465 470 475

gac cag gcg tcc cac agc gca ggc acc aaa gcc cca gcc cta aaa ggg 1551
 Asp Gln Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly
 480 485 490

gga gct gcg gag ctc cgg ccc cct gac gtg ggg cat gtg ctg agg atg 1599
 Gly Ala Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met
 495 500 505

10

ctg ctg ggg aag atg tgc gcg ccg agg tac ccc tcc ggg ggc gcc tgg 1647
 Leu Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp
 510 515 520 525

20

gac cct cac cca ggc cag ggc ttc ggg gag agc atg tat ctg ctc tcg 1695
 Asp Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu Ser
 530 535 540

gac aag gcc acc tcg ccg ctc tcg ctg gat gct ggc ctc ggg cag gcc 1743
 Asp Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly Gln Ala
 545 550 555

30

ccc tgg agc gac ctg ctt ctt tgg gca ctg ttg ctg aac agg gca cag 1791
 Pro Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn Arg Ala Gln
 560 565 570

atg gcc atg tac ttc tgg gag atg ggt tcc aat gca gtt tcc tca gct 1839
 Met Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala Val Ser Ser Ala

40

575	580	585		
ctt ggg gcc tgt ttg ctg ctc cgg gtg atg gca cgc ctg gag cct gac			1887	
Leu Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Glu Pro Asp				
590	595	600	605	
gct gag gag gca gca cgg agg aaa gac ctg gcg ttc aag ttt gag ggg			1935	10
Ala Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu Ala Phe Lys Phe Glu Gly				
	610	615	620	
atg ggc gtt gac ctc ttt ggc gag tgc tat cgc agc agt gag gtg agg			1983	
Met Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg				
	625	630	635	
gct gcc cgc ctc ctc ctc cgt cgc tgc ccg ctc tgg ggg gat gcc act			2031	
Ala Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr				
	640	645	650	
igc ctc cag ctg gcc atg caa gct gac gcc cgt gcc ttc ttt gcc cag			2079	
Cys Leu Gln Leu Ala Met Gln Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln				
	655	660	665	30
gat ggg gta cag tct ctg ctg aca cag aag tgg tgg gga gat atg gcc			2127	
Asp Gly Val Gln Ser Leu Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala				
670	675	680	685	
agc act aca ccc atc tgg gcc ctg gtt ctc gcc ttc ttt tgc cct cca			2175	
Ser Thr Thr Pro Ile Trp Ala Leu Val Leu Ala Phe Phe Cys Pro Pro				40
	690	695	700	

ctc atc tac acc cgc ctc atc acc ttc agg aaa tca gaa gag gag ccc 2223
 Leu Ile Tyr Thr Arg Leu Ile Thr Phe Arg Lys Ser Glu Glu Glu Pro
 705 710 715

aca cgg gag gag cta gag ttt gac atg gat agt gtc att aat ggg gaa 2271
 Thr Arg Glu Glu Leu Glu Phe Asp Met Asp Ser Val Ile Asn Gly Glu
 720 725 730

10

ggg cct gtc ggg acg gcg gac cca gcc gag aag acg ccg ctg ggg gtc 2319
 Gly Pro Val Gly Thr Ala Asp Pro Ala Glu Lys Thr Pro Leu Gly Val
 735 740 745

ccg cgc cag tcg ggc cgt ccg ggt tgc tgc ggg ggc cgc tgc ggg ggg 2367
 Pro Arg Gln Ser Gly Arg Pro Gly Cys Cys Gly Gly Arg Cys Gly Gly
 750 755 760 765

20

cgc cgg tgc cta cgc cgc tgg ttc cac ttc tgg ggc gcg ccg gtg acc 2415
 Arg Arg Cys Leu Arg Arg Trp Phe His Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr
 770 775 780

30

atc ttc atg ggc aac gtg gtc agc tac ctg ctg ttc ctg ctg ctt ttc 2463
 Ile Phe Met Gly Asn Val Val Ser Tyr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe
 785 790 795

tcg cgg gtg ctg ctc gtg gat ttc cag ccg gcg ccg ccc ggc tcc ctg 2511
 Ser Arg Val Leu Leu Val Asp Phe Gln Pro Ala Pro Pro Gly Ser Leu
 800 805 810

40

gag ctg ctg ctc tat ttc tgg gct ttc acg ctg ctg tgc gag gaa ctg	2559	
Glu Leu Leu Leu Tyr Phe Trp Ala Phe Thr Leu Leu Cys Glu Glu Leu		
815	820	825
cgc cag ggc ctg agc gga ggc ggg ggc agc ctc gcc agc ggg ggc ccc	2607	
Arg Gln Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Gly Pro		
830	835	840 845
ggg cct ggc cat gcc tca ctg agc cag cgc ctg cgc ctc tac ctc gcc	2655	
Gly Pro Gly His Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu Arg Leu Tyr Leu Ala		
	850	855 860
gac agc tgg aac cag tgc gac cta gtg gct ctc acc tgc ttc ctc ctg	2703	
Asp Ser Trp Asn Gln Cys Asp Leu Val Ala Leu Thr Cys Phe Leu Leu		
	865	870 875
ggc gtg ggc tgc cgg ctg acc ccg ggt ttg tac cac ctg ggc cgc act	2751	
Gly Val Gly Cys Arg Leu Thr Pro Gly Leu Tyr His Leu Gly Arg Thr		
	880	885 890
gtc ctc tgc atc gac ttc atg gtt ttc acg gtg cgg ctg ctt cac atc	2799	
Val Leu Cys Ile Asp Phe Met Val Phe Thr Val Arg Leu Leu His Ile		
	895	900 905
ttc acg gtc aac aaa cag ctg ggg ccc aag atc gtc atc gtg agc aag	2847	
Phe Thr Val Asn Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys		
910	915	920 925
atg atg aag gac gtg ttc ttc ttc ctc ttc ttc ctc ggc gtg tgg ctg	2895	

10

20

30

40

Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu
 930 935 940

gta gcc tat ggc gtg gcc acg gag ggg ctc ctg agg cca cgg gac agt 2943
 Val Ala Tyr Gly Val Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser
 945 950 955

gac ttc cca agt atc ctg cgc cgc gtc ttc tac cgt ccc tac ctg cag 2991
 Asp Phe Pro Ser Ile Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln
 960 965 970

10

atc ttc ggg cag att ccc cag gag gac atg gac gtg gcc ctc atg gag 3039
 Ile Phe Gly Gln Ile Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu
 975 980 985

20

cac agc aac tgc tcg tcg gag ccc ggc ttc tgg gca cac cct cct ggg 3087
 His Ser Asn Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly
 990 995 1000 1005

gcc cag gcg ggc acc tgc gtc tcc cag tat gcc aac tgg ctg gtg gtg 3135
 Ala Gln Ala Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val Val
 1010 1015 1020

30

ctg ctc ctc gtc atc ttc ctg ctc gtg gcc aac atc ctg ctg gtc aac 3183
 Leu Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu Val Asn
 1025 1030 1035

ttg ctc att gcc atg ttc agt tac aca ttc ggc aaa gta cag ggc aac 3231
 Leu Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val Gln Gly Asn

40

1040	1045	1050		
agc gat ctc tac tgg aag gcg cag cgt tac cgc ctc atc cgg gaa ttc			3279	
Ser Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Ile Arg Glu Phe				
1055	1060	1065		
cac tct cgg ccc gcg ctg gcc ccg ccc ttt atc gtc atc tcc cac ttg			3327	10
His Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile Val Ile Ser His Leu				
1070	1075	1080	1085	
cgc ctc ctg ctc agg caa ttg tgc agg cga ccc cgg agc ccc cag ccg			3375	
Arg Leu Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg Pro Arg Ser Pro Gln Pro				
1090	1095	1100		20
icc tcc ccg gcc ctc gag cat ttc cgg gtt tac ctt tct aag gaa gcc			3423	
Ser Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala				
1105	1110	1115		
gag cgg aag ctg cta acg tgg gaa tcg gtg cat aag gag aac ttt ctg			3471	
Glu Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu				
1120	1125	1130		30
ctg gca cgc gct agg gac aag cgg gag agc gac tcc gag cgt ctg aag			3519	
Leu Ala Arg Ala Arg Asp Lys Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys				
1135	1140	1145		
cgc acg tcc cag aag gtg gac ttg gca ctg aaa cag ctg gga cac atc			3567	
Arg Thr Ser Gln Lys Val Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile				40
1150	1155	1160	1165	

cgc gag tac gaa cag cgc ctg aaa gtg ctg gag cgg gag gtc cag cag 3615
 Arg Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln
 1170 1175 1180

tgt agc cgc gtc ctg ggg tgg gtg gcc gag gcc ctg agc cgc tct gcc 3663
 Cys Ser Arg Val Leu Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala
 1185 1190 1195

10

ttg ctg ccc cca ggt ggg ccg cca ccc cct gac ctg cct ggg tcc aaa 3711
 Leu Leu Pro Pro Gly Gly Pro Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys
 1200 1205 1210

gac tga gccctgctgg cggacttcaa ggagaagccc ccacagggga ttttgctcct 3767
 Asp
 1215

20

agagtaaggc tcactgggc ctggccccc gcacctggtg gccttgctct tgaggtagc 3827

cccatgtcca tctggccac tgcaggacc accttggga gtgtcactct taaaaccac 3887

30

agcatgcccg gctcctcca gaaccagtc cagcctggga ggatcaaggc ctggatcccg 3947

ggccgttatc catctggagg ctgcaggtc ctggggtaa caggaccac agaccctca 4007

ccactcacag attcctcaca ctggggaat aaagccatt cagaggaaaa aaaa 4061

40

(210) 2

<211> 1214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Val Pro Glu Lys Glu Gln Ser Trp Ile Pro Lys Ile Phe Lys	
1 5 10 15	10
Lys Lys Thr Cys Thr Thr Phe Ile Val Asp Ser Thr Asp Pro Gly Gly	
20 25 30	
Thr Leu Cys Gln Cys Gly Arg Pro Arg Thr Ala His Pro Ala Val Ala	
35 40 45	
Met Glu Asp Ala Phe Gly Ala Ala Val Val Thr Val Trp Asp Ser Asp	
50 55 60	
Ala His Thr Thr Glu Lys Pro Thr Asp Ala Tyr Gly Glu Leu Asp Phe	20
65 70 75 80	
Thr Gly Ala Gly Arg Lys His Ser Asn Phe Leu Arg Leu Ser Asp Arg	
85 90 95	
Thr Asp Pro Ala Ala Val Tyr Ser Leu Val Thr Arg Thr Trp Gly Phe	
100 105 110	
Arg Ala Pro Asn Leu Val Val Ser Val Leu Gly Gly Ser Gly Gly Pro	30
115 120 125	
Val Leu Gln Thr Trp Leu Gln Asp Leu Leu Arg Arg Gly Leu Val Arg	
130 135 140	
Ala Ala Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Val Thr Gly Gly Leu His Thr	
145 150 155 160	
Gly Ile Gly Arg His Val Gly Val Ala Val Arg Asp His Gln Met Ala	
165 170 175	
Ser Thr Gly Gly Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala Pro Trp Gly	40
180 185 190	

Leu Ala Met Gln Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp Gly Val	
660	665 670
Gln Ser Leu Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala Ser Thr Thr	
675	680 685
Pro Ile Trp Ala Leu Val Leu Ala Phe Phe Cys Pro Pro Leu Ile Tyr	
690	695 700
Thr Arg Leu Ile Thr Phe Arg Lys Ser Glu Glu Glu Pro Thr Arg Glu	10
705	710 715 720
Glu Leu Glu Phe Asp Met Asp Ser Val Ile Asn Gly Glu Gly Pro Val	
725	730 735
Gly Thr Ala Asp Pro Ala Glu Lys Thr Pro Leu Gly Val Pro Arg Gln	
740	745 750
Ser Gly Arg Pro Gly Cys Cys Gly Gly Arg Cys Gly Gly Arg Arg Cys	
755	760 765
Leu Arg Arg Trp Phe His Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr Ile Phe Met	
770	775 780
Gly Asn Val Val Ser Tyr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Ser Arg Val	
785	790 795 800
Leu Leu Val Asp Phe Gln Pro Ala Pro Pro Gly Ser Leu Glu Leu Leu	
805	810 815
Leu Tyr Phe Trp Ala Phe Thr Leu Leu Cys Glu Glu Leu Arg Gln Gly	30
820	825 830
Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Gly Pro Gly Pro Gly	
835	840 845
His Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu Arg Leu Tyr Leu Ala Asp Ser Trp	
850	855 860
Asn Gln Cys Asp Leu Val Ala Leu Thr Cys Phe Leu Leu Gly Val Gly	
865	870 875 880
Cys Arg Leu Thr Pro Gly Leu Tyr His Leu Gly Arg Thr Val Leu Cys	40

	885		890		895	
Ile Asp Phe Met Val Phe Thr Val Arg Leu Leu His Ile Phe Thr Val						
	900		905		910	
Asn Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys Met Met Lys						
	915		920		925	
Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val Ala Tyr						
	930		935		940	
Gly Val Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp Phe Pro						10
945		950		955		960
Ser Ile Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe Gly						
	965		970		975	
Gln Ile Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His Ser Asn						
	980		985		990	
Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly Ala Gln Ala						20
	995		1000		1005	
Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val Val Leu Leu Leu						
	1010		1015		1020	
Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu Val Asn Leu Leu Ile						
1025		1030		1035		1040
Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val Gln Gly Asn Ser Asp Leu						
	1045		1050		1055	30
Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Ile Arg Glu Phe His Ser Arg						
	1060		1065		1070	
Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile Val Ile Ser His Leu Arg Leu Leu						
	1075		1080		1085	
Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser Ser Pro						
	1090		1095		1100	
Ala Leu Glu His Phe Arg Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu Arg Lys						40
1105		1110		1115		1120

Leu Leu Thr Trp Glu Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg
 1125 1130 1135
 Ala Arg Asp Lys Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys Arg Thr Ser
 1140 1145 1150
 Gln Lys Val Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr
 1155 1160 1165
 Glu Gln Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg
 1170 1175 1180
 Val Leu Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala Leu Leu Pro
 1185 1190 1195 1200
 Pro Gly Gly Pro Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys Asp
 1205 1210

10

20

<210> 3

<211> 3701

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (223)..(3342)

<400> 3

ggcaccgaggg agcgcgggg ccctgggctg caggaggttg cggcagccgc ggcagcatgg 60

tggtgccgga gaaggagcag agctggatcc ccaagatctt caagaagaag acctgcacga 120

40

cgttcatagt tgactccaca gatccgggga gcctggattg tcaactggggg tctgcacacg 180

ggcatcggcc ggcatgttgg tgtggctgta cgggaccatc ag atg gcc agc act 234

Met Ala Ser Thr

1

ggg ggc acc aag gtg gtg gcc atg ggt gtg gcc ccc tgg ggt gtg gtc 282

Gly Gly Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala Pro Trp Gly Val Val

5

10

15

20

10

cgg aat aga gac acc ctc atc aac ccc aag ggc tcg ttc cct gcg agg 330

Arg Asn Arg Asp Thr Leu Ile Asn Pro Lys Gly Ser Phe Pro Ala Arg

25

30

35

20

tac cgg tgg cgc ggt gac ccg gag gac ggg gtc cag ttt ccc ctg gac 378

Tyr Arg Trp Arg Gly Asp Pro Glu Asp Gly Val Gln Phe Pro Leu Asp

40

45

50

tac aac tac tcg gcc ttc ttc ctg gtg gac gac ggc aca cac ggc tgc 426

Tyr Asn Tyr Ser Ala Phe Phe Leu Val Asp Asp Gly Thr His Gly Cys

55

60

65

30

ctg ggg ggc gag aac cgc ttc cgc ttg cgc ctg gag tcc tac atc tca 474

Leu Gly Gly Glu Asn Arg Phe Arg Leu Arg Leu Glu Ser Tyr Ile Ser

70

75

80

cag cag aag acg ggc gtg gga ggg act gga att gac atc cct gtc ctg 522

Gln Gln Lys Thr Gly Val Gly Gly Thr Gly Ile Asp Ile Pro Val Leu

85

90

95

100

40

ctc ctc ctg att gat ggt gat gag aag atg ttg acg cga ata gag aac	570	
Leu Leu Leu Ile Asp Gly Asp Glu Lys Met Leu Thr Arg Ile Glu Asn		
105 110 115		
gcc acc cag gct cag ctc cca tgt ctc ctc gtg gct ggc tca ggg gga	618	
Ala Thr Gln Ala Gln Leu Pro Cys Leu Leu Val Ala Gly Ser Gly Gly		10
120 125 130		
gct gcg gac tgc ctg gcg gag acc ctg gaa gac act ctg gcc cca ggg	666	
Ala Ala Asp Cys Leu Ala Glu Thr Leu Glu Asp Thr Leu Ala Pro Gly		
135 140 145		
agt ggg gga gcc agg caa ggc gaa gcc cga gat cga atc agg cgt ttc	714	20
Ser Gly Gly Ala Arg Gln Gly Glu Ala Arg Asp Arg Ile Arg Arg Phe		
150 155 160		
ttt ccc aaa ggg gac ctt gag gtc ctg cag gcc cag gtg gag agg att	762	
Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu Val Leu Gln Ala Gln Val Glu Arg Ile		
165 170 175 180		30
atg acc cgg aag gag ctc ctg aca gtc tat tct tct gag gat ggg tct	810	
Met Thr Arg Lys Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ser Ser Glu Asp Gly Ser		
185 190 195		
gag gaa ttc gag acc ata gtt ttg aag gcc ctt gtg aag gcc tgt ggg	858	
Glu Glu Phe Glu Thr Ile Val Leu Lys Ala Leu Val Lys Ala Cys Gly		
200 205 210		40

agc tcg gag gcc tca gcc tac ctg gat gag ctg cgt ttg gct gtg gct	906	
Ser Ser Glu Ala Ser Ala Tyr Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Val Ala		
215	220	225
tgg aac cgc gtg gac att gcc cag agt gaa ctc ttt cgg ggg gac atc	954	
Trp Asn Arg Val Asp Ile Ala Gln Ser Glu Leu Phe Arg Gly Asp Ile		
230	235	240
caa tgg cgg tcc ttc cat ctc gaa gct tcc ctc atg gac gcc ctg ctg	1002	
Gln Trp Arg Ser Phe His Leu Glu Ala Ser Leu Met Asp Ala Leu Leu		
245	250	255 260
aat gac cgg cct gag ttc gtg cgc ttg ctc att tcc cac ggc ctc agc	1050	
Asn Asp Arg Pro Glu Phe Val Arg Leu Leu Ile Ser His Gly Leu Ser		20
265	270	275
ctg ggc cac ttc ctg acc ccg atg cgc ctg gcc caa ctc tac agc gcg	1098	
Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala Gln Leu Tyr Ser Ala		
280	285	290
gcg ccc tcc aac tcg ctc atc cgc aac ctt ttg gac cag gcg tcc cac	1146	30
Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu Asp Gln Ala Ser His		
295	300	305
agc gca ggc acc aaa gcc cca gcc cta aaa ggg gga gct gcg gag ctc	1194	
Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly Gly Ala Ala Glu Leu		
310	315	320
cgg ccc cct gac gtg ggg cat gtg ctg agg atg ctg ctg ggg aag atg	1242	40

Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met Leu Leu Gly Lys Met		
325	330	340
tgc gcg ccg agg tac ccc tcc ggg ggc gcc tgg gac cct cac cca ggc	1290	
Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp Asp Pro His Pro Gly		
	345	355
cag ggc ttc ggg gag agc atg tat ctg ctc tcg gac aag gcc acc tcg	1338	10
Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu Ser Asp Lys Ala Thr Ser		
	360	370
ccg ctc tcg ctg gat gct ggc ctc ggg cag gcc ccc tgg agc gac ctg	1386	
Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly Gln Ala Pro Trp Ser Asp Leu		
	375	385
20		
ctt ctt tgg gca ctg ttg ctg aac agg gca cag atg gcc atg tac ttc	1434	
Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn Arg Ala Gln Met Ala Met Tyr Phe		
	390	400
tgg gag atg ggt tcc aat gca gtt tcc tca gct ctt ggg gcc tgt ttg	1482	
Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala Val Ser Ser Ala Leu Gly Ala Cys Leu		
405	410	420
30		
ctg ctc cgg gtg atg gca cgc ctg gag cct gac gct gag gag gca gca	1530	
Leu Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Glu Pro Asp Ala Glu Glu Ala Ala		
	425	435
cgg agg aaa gac ctg gcg ttc aag ttt gag ggg atg ggc gtt gac ctc	1578	40
Arg Arg Lys Asp Leu Ala Phe Lys Phe Glu Gly Met Gly Val Asp Leu		

440	445	450	
ttt ggc gag tgc tat cgc agc agt gag gtg agg gct gcc cgc ctc ctc			1626
Phe Gly Glu Cys Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg Ala Ala Arg Leu Leu			
455	460	465	
ctc cgt cgc tgc ccg ctc tgg ggg gat gcc act tgc ctc cag ctg gcc			1674
Leu Arg Arg Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr Cys Leu Gln Leu Ala			10
470	475	480	
atg caa gct gac gcc cgt gcc ttc ttt gcc cag gat ggg gta cag tct			1722
Met Gln Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp Gly Val Gln Ser			
485	490	495	500
			20
ctg ctg aca cag aag tgg tgg gga gat atg gcg agc act aca ccc atc			1770
Leu Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala Ser Thr Thr Pro Ile			
505	510	515	
igg gcc ctg gtt ctc gcc ttc ttt tgc cct cca ctc atc tac acc cgc			1818
Trp Ala Leu Val Leu Ala Phe Phe Cys Pro Pro Leu Ile Tyr Thr Arg			
520	525	530	30
ctc atc acc ttc agg aaa tca gaa gag gag ccc aca cgg gag gag cta			1866
Leu Ile Thr Phe Arg Lys Ser Glu Glu Glu Pro Thr Arg Glu Glu Leu			
535	540	545	
gag ttt gac atg gat agt gtc att aat ggg gaa ggg cct gtc ggg acg			1914
Glu Phe Asp Met Asp Ser Val Ile Asn Gly Glu Gly Pro Val Gly Thr			40
550	555	560	

ica ctg agc cag cgc ctg cgc ctc tac ctc gcc gac agc tgg aac cag 2298
 Ser Leu Ser Gln Arg Leu Arg Leu Tyr Leu Ala Asp Ser Trp Asn Gln
 680 685 690

tgc gac cta gtg gct ctc acc tgc ttc ctc ctg ggc gtt ggc tgc cgg 2346
 Cys Asp Leu Val Ala Leu Thr Cys Phe Leu Leu Gly Val Gly Cys Arg
 695 700 705

10

ctg acc ccg ggt ttg tac cac ctg ggc cgc act gtc ctc tgc atc gac 2394
 Leu Thr Pro Gly Leu Tyr His Leu Gly Arg Thr Val Leu Cys Ile Asp
 710 715 720

ttc atg gtt ttc acg gtg cgg ctg ctt cac atc ttc acg gtc aac aaa 2442
 Phe Met Val Phe Thr Val Arg Leu Leu His Ile Phe Thr Val Asn Lys
 725 730 735 740

20

cag ctg ggg ccc aag atc gtc atc gtg agc aag atg atg aag gac gtg 2490
 Gln Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys Met Met Lys Asp Val
 745 750 755

ttc ttc ttc ctc ttc ttc ctc ggc gtg tgg ctg gta gcc tat ggc gtg 2538
 Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly Val
 760 765 770

30

gcc acg gag ggg ctc ctg agg cca cgg gac agt gac ttc cca agt atc 2586
 Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp Phe Pro Ser Ile
 775 780 785

40

ctg cgc cgc gtc ttc tac cgt ccc tac ctg cag atc ttc ggg cag att 2634

Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe Gly Gln Ile
 790 795 800

ccc cag gag gac atg gac gtg gcc ctc atg gag cac agc aac tgc tgc 2682
 Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His Ser Asn Cys Ser
 805 810 815 820

tgc gag ccc ggc ttc tgg gca cac cct cct ggg gcc cag gcg ggc acc 2730
 Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly Ala Gln Ala Gly Thr
 825 830 835

tgc gtc tcc cag tat gcc aac tgg ctg gtg gtg ctg ctc ctc gtc atc 2778
 Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val Val Leu Leu Leu Val Ile
 840 845 850

ttc ctg ctc gtg gcc aac atc ctg ctg gtc aac ttg ctc att gcc atg 2826
 Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu Val Asn Leu Leu Ile Ala Met
 855 860 865

ttc agt tac aca ttc ggc aaa gta cag ggc aac agc gat ctc tac tgg 2874
 Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val Gln Gly Asn Ser Asp Leu Tyr Trp
 870 875 880

aag gcg cag cgt tac cgc ctc atc cgg gaa ttc cac tct cgg ccc gcg 2922
 Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Ile Arg Glu Phe His Ser Arg Pro Ala
 885 890 895 900

ctg gcc ccg ccc ttt atc gtc atc tcc cac ttg cgc ctc ctg ctc agg 2970
 Leu Ala Pro Pro Phe Ile Val Ile Ser His Leu Arg Leu Leu Leu Arg

10

20

30

40

905	910	915		
caa ttg tgc agg cga ccc cgg agc ccc cag ccg tcc tcc ccg gcc ctc			3018	
Gln Leu Cys Arg Arg Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser Ser Pro Ala Leu				
920	925	930		
gag cat ttc cgg gtt tac ctt tct aag gaa gcc gag cgg aag ctg cta			3066	10
Glu His Phe Arg Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Leu				
935	940	945		
acg tgg gaa tcg gtg cat aag gag aac ttt ctg ctg gca cgc gct agg			3114	
Thr Trp Glu Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg Ala Arg				
950	955	960		20
gac aag cgg gag agc gac tcc gag cgt ctg aag cgc acg tcc cag aag			3162	
Asp Lys Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys Arg Thr Ser Gln Lys				
965	970	975	980	
gtg gac ttg gca ctg aaa cag ctg gga cac atc cgc gag tac gaa cag			3210	
Val Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr Glu Gln				
985	990	995		30
cgc ctg aaa gtg ctg gag cgg gag gtc cag cag tgt agc cgc gtc ctg			3258	
Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg Val Leu				
1000	1005	1010		
ggg tgg gtg gcc gag gcc ctg agc cgc tct gcc ttg ctg ccc cca ggt			3306	
Gly Trp Val Ala Glu Ala Leu Ser Arg Ser Ala Leu Leu Pro Pro Gly				40
1015	1020	1025		

ggg ccg cca ccc cct gac ctg cct ggg tcc aaa gac tga gccctgctgg 3355
 Gly Pro Pro Pro Pro Asp Leu Pro Gly Ser Lys Asp
 1030 1035 1040

cggacttcaa ggagaagccc ccacagggga ttttgcctct agagtaaggc tcacttgggc 3415

10

ctggccccc gcacctggtg gccctgtcct tgaggtgagc cccatgtcca tctgggccac 3475

tgcaggacc accttggga gtgtcactct taaaaccac agcatgcccg gctcctccca 3535

gaaccagicc cagcctggga ggaatcaaggc ctggatcccg ggccgttacc catctggacg 3595

ctgcaggctc ctggggtaa caggaccac agaccctca ccactcacag attcctcaca 3655

20

ctgggaaat aaagccattt cagaggaaa aaaaaaaaa aaaaaa 3701

<210> 4

<211> 1040

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 4

Met Ala Ser Thr Gly Gly Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala Pro
 1 5 10 15
 Trp Gly Val Val Arg Asn Arg Asp Thr Leu Ile Asn Pro Lys Gly Ser
 20 25 30
 Phe Pro Ala Arg Tyr Arg Trp Arg Gly Asp Pro Glu Asp Gly Val Gln

40

His Gly Leu Ser Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala Gln	
275	280 285
Leu Tyr Ser Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu Asp	
290	295 300
Gln Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly Gly	
305	310 315 320
Ala Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met Leu	10
325	330 335
Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp Asp	
340	345 350
Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu Ser Asp	
355	360 365
Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly Gln Ala Pro	
370	375 380
Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn Arg Ala Gln Met	20
385	390 395 400
Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala Val Ser Ser Ala Leu	
405	410 415
Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Glu Pro Asp Ala	
420	425 430
Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu Ala Phe Lys Phe Glu Gly Met	30
435	440 445
Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg Ala	
450	455 460
Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr Cys	
465	470 475 480
Leu Gln Leu Ala Met Gln Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp	
485	490 495
Gly Val Gln Ser Leu Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala Ser	40

Thr Val Asn Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys Met	
740	745
Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val	
755	760
Ala Tyr Gly Val Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp	
770	775
Phe Pro Ser Ile Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile	10
785	790
Phe Gly Gln Ile Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His	
805	810
Ser Asn Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly Ala	
820	825
Gln Ala Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val Val Leu	20
835	840
Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu Val Asn Leu	
850	855
Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val Gln Gly Asn Ser	
865	870
Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Ile Arg Glu Phe His	
885	890
Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile Val Ile Ser His Leu Arg	30
900	905
Leu Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser	
915	920
Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu	
930	935
Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu	40
945	950
Ala Arg Ala Arg Asp Lys Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Lys Arg	

agagcacagg agcctggatt gtcactgggg gtctgcacac gggcatcggc cggcatgttg 300

gtgtggcigt acgggaccaa cag atg gcc agc act ggg ggc acc aag gtg gtg 353

Met Ala Ser Thr Gly Gly Thr Lys Val Val

1 5 10

gcc atg ggt gtg gcc ccc tgg ggt gtg gtc cgg aat aga gac acc ctc 401

Ala Met Gly Val Ala Pro Trp Gly Val Val Arg Asn Arg Asp Thr Leu

15 20 25

10

atc aac ccc aag ggc tcg ttc cct gcg agg tac cgg tgg cgc ggt gac 449

Ile Asn Pro Lys Gly Ser Phe Pro Ala Arg Tyr Arg Trp Arg Gly Asp

30 35 40

20

ccg gag gac ggg gtc cag ttt ccc ctg gac tac aac tac tcg gcc ttc 497

Pro Glu Asp Gly Val Gln Phe Pro Leu Asp Tyr Asn Tyr Ser Ala Phe

45 50 55

ttc ctg gtg gac gac ggc aca cac ggc tgc ctg ggg ggc gag aac cgc 545

Phe Leu Val Asp Asp Gly Thr His Gly Cys Leu Gly Gly Glu Asn Arg

60 65 70

30

ttc cgc ttg cgc ctg gag tcc tac atc tca cag cag aag acg ggc gtg 593

Phe Arg Leu Arg Leu Glu Ser Tyr Ile Ser Gln Gln Lys Thr Gly Val

75 80 85 90

gga ggg act gga att gac atc cct gtc ctg ctc ctc ctg att gat ggt 641

Gly Gly Thr Gly Ile Asp Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Gly

40

95	100	105	
gat gag aag atg ttg acg cga ata gag aac gcc acc cag gct cag ctc			689
Asp Glu Lys Met Leu Thr Arg Ile Glu Asn Ala Thr Gln Ala Gln Leu			
110	115	120	
cca tgt ctc ctc gtg gct ggc tca ggg gga gct gcg gac tgc ctg gcg			737
Pro Cys Leu Leu Val Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala Asp Cys Leu Ala			10
125	130	135	
gag acc ctg gaa gac act ctg gcc cca ggg agt ggg gga gcc agg caa			785
Glu Thr Leu Glu Asp Thr Leu Ala Pro Gly Ser Gly Gly Ala Arg Gln			
140	145	150	
ggc gaa gcc cga gat cga atc agg cgt ttc ttt ccc aaa ggg gac ctt			833
Gly Glu Ala Arg Asp Arg Ile Arg Arg Phe Phe Pro Lys Gly Asp Leu			20
155	160	165	170
gag gtc ctg cag gcc cag gtg gag agg att atg acc cgg aag gag ctc			881
Glu Val Leu Gln Ala Gln Val Glu Arg Ile Met Thr Arg Lys Glu Leu			
175	180	185	30
ctg aca gtc tat tct tct gag gat ggg tct gag gaa ttc gag acc ata			929
Leu Thr Val Tyr Ser Ser Glu Asp Gly Ser Glu Glu Phe Glu Thr Ile			
190	195	200	
gtt ttg aag gcc ctt gtg aag gcc tgt ggg agc tcg gag gcc tca gcc			977
Val Leu Lys Ala Leu Val Lys Ala Cys Gly Ser Ser Glu Ala Ser Ala			40
205	210	215	

tac ctg gat gag ctg cgt ttg gct gtg gct tgg aac cgc gtg gac att 1025
 Tyr Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg Val Asp Ile
 220 225 230

gcc cag agt gaa ctc ttt cgg ggg gac atc caa tgg cgg tcc ttc cat 1073
 Ala Gln Ser Glu Leu Phe Arg Gly Asp Ile Gln Trp Arg Ser Phe His
 235 240 245 250

ctc gaa gct tcc ctc atg gac gcc ctg ctg aat gac cgg cct gag ttc 1121
 Leu Glu Ala Ser Leu Met Asp Ala Leu Leu Asn Asp Arg Pro Glu Phe
 255 260 265

gtg cgc ttg ctc att tcc cac ggc ctc agc ctg ggc cac ttc ctg acc 1169
 Val Arg Leu Leu Ile Ser His Gly Leu Ser Leu Gly His Phe Leu Thr
 270 275 280

ccg atg cgc ctg gcc caa ctc tac agc gcg gcg ccc tcc aac tcg ctc 1217
 Pro Met Arg Leu Ala Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu
 285 290 295

atc cgc aac ctt ttg gac cag gcg tcc cac agc gca ggc acc aaa gcc 1265
 Ile Arg Asn Leu Leu Asp Gln Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala
 300 305 310

cca gcc cta aaa ggg gga gct gcg gag ctc cgg ccc cct gac gtg ggg 1313
 Pro Ala Leu Lys Gly Gly Ala Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly
 315 320 325 330

10

20

30

40

cat gtc ctg agg atg ctg ctg ggg aag atg tgc gcg ccg agg tac ccc 1361
 His Val Leu Arg Met Leu Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro
 335 340 345

tcc ggg ggc gcc tgg gac cct cac cca ggc cag ggc ttc ggg gag agc 1409
 Ser Gly Gly Ala Trp Asp Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser
 350 355 360

10

atg tat ctg ctc tcg gac aag gcc acc tcg ccg ctc tcg ctg gat gct 1457
 Met Tyr Leu Leu Ser Asp Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala
 365 370 375

ggc ctc ggg cag gcc ccc tgg agc gac ctg ctt ctt tgg gca ctg ttg 1505
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu
 380 385 390

20

ctg aac agg gca cag atg gcc atg tac ttc tgg gag atg ggt tcc aat 1553
 Leu Asn Arg Ala Gln Met Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn
 395 400 405 410

gca gtt tcc tca gct ctt ggg gcc tgt ttg ctg ctc cgg gtg atg gca 1601
 Ala Val Ser Ser Ala Leu Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala
 415 420 425

30

cgc ctg gag cct gac gct gag gag gca gca cgg agg aaa gac ctg gcg 1649
 Arg Leu Glu Pro Asp Ala Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu Ala
 430 435 440

40

ttc aag ttt gag ggg atg ggc gtt gac ctc ttt ggc gag tgc tat cgc 1697

Phe Lys Phe Glu Gly Met Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys Tyr Arg
 445 450 455

agc agt gag gtg agg gct gcc cgc ctc ctc ctc cgt cgc tgc ccg ctc 1745
 Ser Ser Glu Val Arg Ala Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg Cys Pro Leu
 460 465 470

tgg ggg gat gcc act tgc ctc cag ctg gcc atg caa gct gac gcc cgt 1793
 Trp Gly Asp Ala Thr Cys Leu Gln Leu Ala Met Gln Ala Asp Ala Arg
 475 480 485 490

gcc ttc ttt gcc cag gat ggg gta cag tct ctg ctg aca cag aag tgg 1841
 Ala Phe Phe Ala Gln Asp Gly Val Gln Ser Leu Leu Thr Gln Lys Trp
 495 500 505

tgg gga gat atg gcc agc act aca ccc atc tgg gcc ctg gtt ctc gcc 1889
 Trp Gly Asp Met Ala Ser Thr Thr Pro Ile Trp Ala Leu Val Leu Ala
 510 515 520

ttc ttt tgc cct cca ctc atc tac acc cgc ctc atc acc ttc agg aaa 1937
 Phe Phe Cys Pro Pro Leu Ile Tyr Thr Arg Leu Ile Thr Phe Arg Lys
 525 530 535

tca gaa gag gag ccc aca cgg gag gag cta gag ttt gac atg gat agt 1985
 Ser Glu Glu Glu Pro Thr Arg Glu Glu Leu Glu Phe Asp Met Asp Ser
 540 545 550

gtc att aat ggg gaa ggg cct gtc ggg acg gcg gac cca gcc gag aag 2033
 Val Ile Asn Gly Glu Gly Pro Val Gly Thr Ala Asp Pro Ala Glu Lys

10

20

30

40

555	560	565	570		
acg ccg ctg ggg gtc ccg cgc cag tcg ggc cgt ccg ggt tgc tgc ggg				2081	
Thr Pro Leu Gly Val Pro Arg Gln Ser Gly Arg Pro Gly Cys Cys Gly					
	575	580	585		
ggc cgc tgc ggg ggg cgc cgg tgc cta cgc cgc tgg ttc cac ttc tgg				2129	10
Gly Arg Cys Gly Gly Arg Arg Cys Leu Arg Arg Trp Phe His Phe Trp					
	590	595	600		
ggc gcg ccg gtg acc atc ttc atg ggc aac gtg gtc agc tac ctg ctg				2177	
Gly Ala Pro Val Thr Ile Phe Met Gly Asn Val Val Ser Tyr Leu Leu					
	605	610	615		20
ttc ttg ctg ctt ttc tcg cgg gtg ctg ctc gtg gat ttc cag ccg gcg				2225	
Phe Leu Leu Leu Phe Ser Arg Val Leu Leu Val Asp Phe Gln Pro Ala					
	620	625	630		
ccg ccc ggc tcc ctg gag ctg ctg ctc tat ttc tgg gct ttc acg ctg				2273	
Pro Pro Gly Ser Leu Glu Leu Leu Leu Tyr Phe Trp Ala Phe Thr Leu					
	635	640	645	650	30
ctg tgc gag gaa ctg cgc cag ggc ctg agc gga ggc ggg ggc agc ctc				2321	
Leu Cys Glu Glu Leu Arg Gln Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu					
	655	660	665		
gcc agc ggg ggc ccc ggg cct ggc cat gcc tca ctg agc cag cgc ctg				2369	
Ala Ser Gly Gly Pro Gly Pro Gly His Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu					40
	670	675	680		

cgc ctc tac ctc gcc gac agc tgg aac cag tgc gac cta gtg gct ctc	2417	
Arg Leu Tyr Leu Ala Asp Ser Trp Asn Gln Cys Asp Leu Val Ala Leu		
685	690	695
acc tgc ttc ctc ctg ggc gtg ggc tgc cgg ctg acc ccg ggt ttg tac	2465	
Thr Cys Phe Leu Leu Gly Val Gly Cys Arg Leu Thr Pro Gly Leu Tyr		10
700	705	710
cac ctg ggc cgc act gtc ctc tgc atc gac ttc atg gtt ttc acg gtg	2513	
His Leu Gly Arg Thr Val Leu Cys Ile Asp Phe Met Val Phe Thr Val		
715	720	725
730		
cgg ctg ctt cac atc ttc acg gtc aac aaa cag ctg ggg ccc aag atc	2561	20
Arg Leu Leu His Ile Phe Thr Val Asn Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile		
735	740	745
gtc atc gtg agc aag atg atg aag gac gtg ttc ttc ttc ctc ttc ttc	2609	
Val Ile Val Ser Lys Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe		
750	755	760
ctc ggc gtg tgg ctg gta gcc tat ggc gtg gcc acg gag ggg ctc ctg	2657	
Leu Gly Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly Val Ala Thr Glu Gly Leu Leu		
765	770	775
agg cca cgg gac agt gac ttc cca agt atc ctg cgc cgc gtc ttc tac	2705	
Arg Pro Arg Asp Ser Asp Phe Pro Ser Ile Leu Arg Arg Val Phe Tyr		
780	785	790
		40

cgt ccc tac ctg cag atc ttc ggg cag att ccc cag gag gac atg gac 2753
 Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe Gly Gln Ile Pro Gln Glu Asp Met Asp
 795 800 805 810

gtg gcc ctc atg gag cac agc aac tgc tgc tgc gag ccc ggc ttc tgg 2801
 Val Ala Leu Met Glu His Ser Asn Cys Ser Ser Glu Pro Gly Phe Trp
 815 820 825

10

gca cac cct cct ggg gcc cag gcg ggc acc tgc gtc tcc cag tat gcc 2849
 Ala His Pro Pro Gly Ala Gln Ala Gly Thr Cys Val Ser Gln Tyr Ala
 830 835 840

aac tgg ctg gtg gtg ctg ctc ctc gtc atc ttc ctg ctc gtg gcc aac 2897
 Asn Trp Leu Val Val Leu Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Val Ala Asn
 845 850 855

20

atc ctg ctg gtc aac ttg ctc att gcc atg ttc agt tac aca ttc ggc 2945
 Ile Leu Leu Val Asn Leu Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gly
 860 865 870

aaa gta cag ggc aac agc gat ctc tac tgg aag gcg cag cgt tac cgc 2993
 Lys Val Gln Gly Asn Ser Asp Leu Tyr Trp Lys Ala Gln Arg Tyr Arg
 875 880 885 890

30

ctc atc cgg gaa ttc cac tct cgg ccc gcg ctg gcc ccg ccc ttt atc 3041
 Leu Ile Arg Glu Phe His Ser Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile
 895 900 905

40

gtc atc tcc cac ttg cgc ctc ctg ctc agg caa ttg tgc agg cga ccc 3089

Val Ile Ser His Leu Arg Leu Leu Leu Arg Gln Leu Cys Arg Arg Pro
 910 915 920

cgg agc ccc cag ccg tcc tcc ccg gcc ctc gag cat ttc cgg gtt tac 3137
 Arg Ser Pro Gln Pro Ser Ser Pro Ala Leu Glu His Phe Arg Val Tyr
 925 930 935

ctt tct aag gaa gcc gag cgg aag ctg cta acg tgg gaa tcg gtg cat 3185
 Leu Ser Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Leu Thr Trp Glu Ser Val His
 940 945 950

aag gag aac ttt ctg ctg gca cgc gct agg gac aag cgg gag agc gac 3233
 Lys Glu Asn Phe Leu Leu Ala Arg Ala Arg Asp Lys Arg Glu Ser Asp
 955 960 965 970

tcc gag cgt ctg gag cgc acg tcc cag aag gtg gac ttg gca ctg aaa 3281
 Ser Glu Arg Leu Glu Arg Thr Ser Gln Lys Val Asp Leu Ala Leu Lys
 975 980 985

cag ctg gga cac atc cgc gag tac gaa cag cgc ctg aaa gtg ctg gag 3329
 Gln Leu Gly His Ile Arg Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Lys Val Leu Glu
 990 995 1000

cgg gag gtc cag cag tgt agc cgc gtc ctg ggg tgg gtg acg tag 3374
 Arg Glu Val Gln Gln Cys Ser Arg Val Leu Gly Trp Val Thr
 1005 1010 1015

gccgttagca gctctgccaat gttgccctca ggtgggcccgc cacccttga cctgcatggg 3434

10

20

30

40

iccaaagagt gagccatgct ggcggatttt aaggagaagc cccacaggg gattttgctc 3494
 itagagtaag gctcatgtgg gcctcggccc ccgcacctgg tggccttgtc cttagagtga 3554
 gcccctatgc catctgggcc actgtcagga ccacctttgg gactgtcatc ctacaaaacc 3614
 acagcatgcc cggctctcc cagaaccagt cccagcctgg gaggatcaag gccctggatcc 3674
 cgggccgita tccatctgga ggctgcaggg tccttgggggt aacagggacc acagaccctt 3734
 caccctcac agattctca cactggggaa ataaagccat ttcagaggaa aaaaaaaaaa 3794
 aaaaaaaaaa aaaaaa 3810

10

20

<210> 6
 <211> 1016
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Ser Thr Gly Gly Thr Lys Val Val Ala Met Gly Val Ala Pro
 1 5 10 15
 Trp Gly Val Val Arg Asn Arg Asp Thr Leu Ile Asn Pro Lys Gly Ser
 20 25 30
 Phe Pro Ala Arg Tyr Arg Trp Arg Gly Asp Pro Glu Asp Gly Val Gln
 35 40 45
 Phe Pro Leu Asp Tyr Asn Tyr Ser Ala Phe Phe Leu Val Asp Asp Gly
 50 55 60

30

40

Thr His Gly Cys Leu Gly Gly Glu Asn Arg Phe Arg Leu Arg Leu Glu	
65	70
Ser Tyr Ile Ser Gln Gln Lys Thr Gly Val Gly Gly Thr Gly Ile Asp	
	85
Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ile Asp Gly Asp Glu Lys Met Leu Thr	
	100
Arg Ile Glu Asn Ala Thr Gln Ala Gln Leu Pro Cys Leu Leu Val Ala	10
115	120
Gly Ser Gly Gly Ala Ala Asp Cys Leu Ala Glu Thr Leu Glu Asp Thr	
130	135
Leu Ala Pro Gly Ser Gly Gly Ala Arg Gln Gly Glu Ala Arg Asp Arg	
145	150
Ile Arg Arg Phe Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu Val Leu Gln Ala Gln	
	165
	170
	175
Val Glu Arg Ile Met Thr Arg Lys Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ser Ser	20
	180
	185
	190
Glu Asp Gly Ser Glu Glu Phe Glu Thr Ile Val Leu Lys Ala Leu Val	
195	200
	205
Lys Ala Cys Gly Ser Ser Glu Ala Ser Ala Tyr Leu Asp Glu Leu Arg	
210	215
	220
Leu Ala Val Ala Trp Asn Arg Val Asp Ile Ala Gln Ser Glu Leu Phe	30
225	230
	235
Arg Gly Asp Ile Gln Trp Arg Ser Phe His Leu Glu Ala Ser Leu Met	
	245
	250
	255
Asp Ala Leu Leu Asn Asp Arg Pro Glu Phe Val Arg Leu Leu Ile Ser	
	260
	265
	270
His Gly Leu Ser Leu Gly His Phe Leu Thr Pro Met Arg Leu Ala Gln	
	275
	280
	285
Leu Tyr Ser Ala Ala Pro Ser Asn Ser Leu Ile Arg Asn Leu Leu Asp	40

290	295	300	
Gln Ala Ser His Ser Ala Gly Thr Lys Ala Pro Ala Leu Lys Gly Gly			
305	310	315	320
Ala Ala Glu Leu Arg Pro Pro Asp Val Gly His Val Leu Arg Met Leu			
	325	330	335
Leu Gly Lys Met Cys Ala Pro Arg Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Trp Asp			
	340	345	350
Pro His Pro Gly Gln Gly Phe Gly Glu Ser Met Tyr Leu Leu Ser Asp			10
	355	360	365
Lys Ala Thr Ser Pro Leu Ser Leu Asp Ala Gly Leu Gly Gln Ala Pro			
	370	375	380
Trp Ser Asp Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Asn Arg Ala Gln Met			
385	390	395	400
Ala Met Tyr Phe Trp Glu Met Gly Ser Asn Ala Val Ser Ser Ala Leu			20
	405	410	415
Gly Ala Cys Leu Leu Leu Arg Val Met Ala Arg Leu Glu Pro Asp Ala			
	420	425	430
Glu Glu Ala Ala Arg Arg Lys Asp Leu Ala Phe Lys Phe Glu Gly Met			
	435	440	445
Gly Val Asp Leu Phe Gly Glu Cys Tyr Arg Ser Ser Glu Val Arg Ala			
	450	455	460
Ala Arg Leu Leu Leu Arg Arg Cys Pro Leu Trp Gly Asp Ala Thr Cys			
465	470	475	480
Leu Gln Leu Ala Met Gln Ala Asp Ala Arg Ala Phe Phe Ala Gln Asp			
	485	490	495
Gly Val Gln Ser Leu Leu Thr Gln Lys Trp Trp Gly Asp Met Ala Ser			
	500	505	510
Thr Thr Pro Ile Trp Ala Leu Val Leu Ala Phe Phe Cys Pro Pro Leu			40
	515	520	525

Ile Tyr Thr Arg Leu Ile Thr Phe Arg Lys Ser Glu Glu Glu Pro Thr	
530	535 540
Arg Glu Glu Leu Glu Phe Asp Met Asp Ser Val Ile Asn Gly Glu Gly	
545	550 555 560
Pro Val Gly Thr Ala Asp Pro Ala Glu Lys Thr Pro Leu Gly Val Pro	
	565 570 575
Arg Gln Ser Gly Arg Pro Gly Cys Cys Gly Gly Arg Cys Gly Gly Arg	10
	580 585 590
Arg Cys Leu Arg Arg Trp Phe His Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr Ile	
	595 600 605
Phe Met Gly Asn Val Val Ser Tyr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Ser	
	610 615 620
Arg Val Leu Leu Val Asp Phe Gln Pro Ala Pro Pro Gly Ser Leu Glu	
625	630 635 640
Leu Leu Leu Tyr Phe Trp Ala Phe Thr Leu Leu Cys Glu Glu Leu Arg	
	645 650 655
Gln Gly Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Gly Pro Gly	
	660 665 670
Pro Gly His Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu Arg Leu Tyr Leu Ala Asp	
	675 680 685
Ser Trp Asn Gln Cys Asp Leu Val Ala Leu Thr Cys Phe Leu Leu Gly	30
	690 695 700
Val Gly Cys Arg Leu Thr Pro Gly Leu Tyr His Leu Gly Arg Thr Val	
705	710 715 720
Leu Cys Ile Asp Phe Met Val Phe Thr Val Arg Leu Leu His Ile Phe	
	725 730 735
Thr Val Asn Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Val Ile Val Ser Lys Met	
	740 745 750
Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu Gly Val Trp Leu Val	40

755	760	765	
Ala Tyr Gly Val	Ala Thr Glu Gly Leu Leu Arg Pro Arg Asp Ser Asp		
770	775	780	
Phe Pro Ser Ile	Leu Arg Arg Val Phe Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile		
785	790	795	800
Phe Gly Gln Ile	Pro Gln Glu Asp Met Asp Val Ala Leu Met Glu His		
	805	810	815
Ser Asn Cys Ser	Ser Glu Pro Gly Phe Trp Ala His Pro Pro Gly Ala		10
	820	825	830
Gln Ala Gly Thr	Cys Val Ser Gln Tyr Ala Asn Trp Leu Val Val Leu		
	835	840	845
Leu Leu Val Ile	Phe Leu Leu Val Ala Asn Ile Leu Leu Val Asn Leu		
	850	855	860
Leu Ile Ala Met	Phe Ser Tyr Thr Phe Gly Lys Val Gln Gly Asn Ser		20
865	870	875	880
Asp Leu Tyr Trp	Lys Ala Gln Arg Tyr Arg Leu Ile Arg Glu Phe His		
	885	890	895
Ser Arg Pro Ala	Leu Ala Pro Pro Phe Ile Val Ile Ser His Leu Arg		
	900	905	910
Leu Leu Leu Arg	Gln Leu Cys Arg Arg Pro Arg Ser Pro Gln Pro Ser		30
	915	920	925
Ser Pro Ala Leu	Glu His Phe Arg Val Tyr Leu Ser Lys Glu Ala Glu		
	930	935	940
Arg Lys Leu Leu	Thr Trp Glu Ser Val His Lys Glu Asn Phe Leu Leu		
945	950	955	960
Ala Arg Ala Arg	Asp Lys Arg Glu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Glu Arg		
	965	970	975
Thr Ser Gln Lys	Val Asp Leu Ala Leu Lys Gln Leu Gly His Ile Arg		40
	980	985	990

Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Lys Val Leu Glu Arg Glu Val Gln Gln Cys
 995 1000 1005
 Ser Arg Val Leu Gly Trp Val Thr
 1010 1015

10

<210> 7
 <211> 1758
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (32)..(1399)

20

<400> 7

cacgagcggc acgaggattt ccagctcagc g atg ccc cca ggt ccc tgg gag 52
 Met Pro Pro Gly Pro Trp Glu
 1 5

30

agc tgc ttc tgg gtg ggg ggc ctc att ttg tgg ctc agc gtt gga agt 100
 Ser Cys Phe Trp Val Gly Gly Leu Ile Leu Trp Leu Ser Val Gly Ser
 10 15 20

tca ggg gat gca cct cct acc cca cag cca aag tgc gct gac ttc cag 148
 Ser Gly Asp Ala Pro Pro Thr Pro Gln Pro Lys Cys Ala Asp Phe Gln
 25 30 35

40

Val Leu Gly Val Ser Glu Ser Ser Ile His Ile Ile Gly Val Ser Leu
 155 160 165

ggg gcc cac gtt ggg ggc atg gtg gga cag ctc ttc gga ggc cag ctg 580
 Gly Ala His Val Gly Gly Met Val Gly Gln Leu Phe Gly Gly Gln Leu
 170 175 180

gga cag atc aca ggc ctg gac ccc gct gga cct gag tac acc agg gcc 628
 Gly Gln Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Glu Tyr Thr Arg Ala
 185 190 195

10

agt gtg gaa gag cgc ttg gat gct gga gat gcc ctc ttc gtg gaa gcc 676
 Ser Val Glu Glu Arg Leu Asp Ala Gly Asp Ala Leu Phe Val Glu Ala
 200 205 210 215

20

atc cac aca gac acc gac aat ttg ggt att cgg att ccc gtt gga cat 724
 Ile His Thr Asp Thr Asp Asn Leu Gly Ile Arg Ile Pro Val Gly His
 220 225 230

gtg gac tac ttc gtc aac gga ggc caa gac caa cct ggc tgc ccc acc 772
 Val Asp Tyr Phe Val Asn Gly Gly Gln Asp Gln Pro Gly Cys Pro Thr
 235 240 245

30

ttc ttt tac gca ggt tat agt tat ctg atc tgt gat cac atg agg gct 820
 Phe Phe Tyr Ala Gly Tyr Ser Tyr Leu Ile Cys Asp His Met Arg Ala
 250 255 260

gtg cac ctc tac atc agc gcc ctg gag aat tcc tgt cca ctg atg gcc 868
 Val His Leu Tyr Ile Ser Ala Leu Glu Asn Ser Cys Pro Leu Met Ala

40

265	270	275		
ttt ccc tgt gcc agc tac aag gcc ttc ctt gct gga cgc tgt ctg gat	916			
Phe Pro Cys Ala Ser Tyr Lys Ala Phe Leu Ala Gly Arg Cys Leu Asp				
280	285	290	295	
igc ttt aac cct ttt ctg ctt tcc tgc cca agg ata gga ctg gtg gaa	964			10
Cys Phe Asn Pro Phe Leu Leu Ser Cys Pro Arg Ile Gly Leu Val Glu				
	300	305	310	
caa ggt ggt gtc aag ata gag ccg ctc ccc aag gaa gtg aaa gtc tac	1012			
Gln Gly Gly Val Lys Ile Glu Pro Leu Pro Lys Glu Val Lys Val Tyr				
	315	320	325	20
ctc ctg act act tcc agt gct ccg tac tgc atg cat cac agc ctc gtg	1060			
Leu Leu Thr Thr Ser Ser Ala Pro Tyr Cys Met His His Ser Leu Val				
	330	335	340	
gag ttt cac ttg aag gaa ctg aga aac aag gac acc aac atc gag gtt	1108			
Glu Phe His Leu Lys Glu Leu Arg Asn Lys Asp Thr Asn Ile Glu Val				
	345	350	355	30
acc ttc ctt agc agt aac atc acc tct tca tct aag atc acc ata cct	1156			
Thr Phe Leu Ser Ser Asn Ile Thr Ser Ser Ser Lys Ile Thr Ile Pro				
360	365	370	375	
aag cag caa cgc tat ggg aaa gga atc ata gcc cat gcc acc cca caa	1204			
Lys Gln Gln Arg Tyr Gly Lys Gly Ile Ile Ala His Ala Thr Pro Gln				40
	380	385	390	

tgc cag ata aac caa gtg aaa ttc aag ttt cag tct tcc aac cga gtt 1252
 Cys Gln Ile Asn Gln Val Lys Phe Lys Phe Gln Ser Ser Asn Arg Val
 395 400 405

tgg aaa aaa gac cgg act acc att att ggg aag ttc tgc act gcc ctt 1300
 Trp Lys Lys Asp Arg Thr Thr Ile Ile Gly Lys Phe Cys Thr Ala Leu 10
 410 415 420

ttg cct gtc aat gac aga gaa aag atg gtc tgc tta cct gaa cca gtg 1348
 Leu Pro Val Asn Asp Arg Glu Lys Met Val Cys Leu Pro Glu Pro Val
 425 430 435

aac tta caa gca agt gtg act gtt tcc tgt gac ctg aag ata gcc tgt 1396 20
 Asn Leu Gln Ala Ser Val Thr Val Ser Cys Asp Leu Lys Ile Ala Cys
 440 445 450 455

gtg tag ttaacctgg gcaggacaca tctccctgca ttttttttt tttttttga 1452
 Val

gagagaggig tgaigagga tgtgtgtgtg cagcittatg tagaccatta ctactaagga 1512 30

gaaaagcaaa gctctttctt attttctca taatcagcta ccttggaggg gagggagaac 1572

tcattttaca gaacttgggt tctttgccc atcttatgta cataccatt ttagctttcc 1632

catgcatact taactgcact tgcittatct ccttgggcat tegtacttag gattcaatag 1692 40

aaacaigtac agggtaaaca attttttaaa aataaaactt catggagtaa aaaaaaaaaa 1752

aaaaaa

1758

<210> 8

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 8

Met Pro Pro Gly Pro Trp Glu Ser Cys Phe Trp Val Gly Gly Leu Ile

1

5

10

15

Leu Trp Leu Ser Val Gly Ser Ser Gly Asp Ala Pro Pro Thr Pro Gln

20

25

30

20

Pro Lys Cys Ala Asp Phe Gln Ser Ala Asn Leu Phe Glu Gly Thr Asp

35

40

45

Leu Lys Val Gln Phe Leu Leu Phe Val Pro Ser Asn Pro Ser Cys Gly

50

55

60

Gln Leu Val Glu Gly Ser Ser Asp Leu Gln Asn Ser Gly Phe Asn Ala

65

70

75

80

Thr Leu Gly Thr Lys Leu Ile Ile His Gly Phe Arg Val Leu Gly Thr

85

90

95

30

Lys Pro Ser Trp Ile Asp Thr Phe Ile Arg Thr Leu Leu Arg Ala Thr

100

105

110

Asn Ala Asn Val Ile Ala Val Asp Trp Ile Tyr Gly Ser Thr Gly Val

115

120

125

Tyr Phe Ser Ala Val Lys Asn Val Ile Lys Leu Ser Leu Glu Ile Ser

130

135

140

40

Leu Phe Leu Asn Lys Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Glu Ser Ser Ile

145	150	155	160	
His Ile Ile Gly Val Ser Leu Gly Ala His Val Gly Gly Met Val Gly				
	165	170	175	
Gln Leu Phe Gly Gly Gln Leu Gly Gln Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala				
	180	185	190	
Gly Pro Glu Tyr Thr Arg Ala Ser Val Glu Glu Arg Leu Asp Ala Gly				
	195	200	205	10
Asp Ala Leu Phe Val Glu Ala Ile His Thr Asp Thr Asp Asn Leu Gly				
	210	215	220	
Ile Arg Ile Pro Val Gly His Val Asp Tyr Phe Val Asn Gly Gly Gln				
225	230	235	240	
Asp Gln Pro Gly Cys Pro Thr Phe Phe Tyr Ala Gly Tyr Ser Tyr Leu				
	245	250	255	
Ile Cys Asp His Met Arg Ala Val His Leu Tyr Ile Ser Ala Leu Glu				20
	260	265	270	
Asn Ser Cys Pro Leu Met Ala Phe Pro Cys Ala Ser Tyr Lys Ala Phe				
	275	280	285	
Leu Ala Gly Arg Cys Leu Asp Cys Phe Asn Pro Phe Leu Leu Ser Cys				
	290	295	300	
Pro Arg Ile Gly Leu Val Glu Gln Gly Gly Val Lys Ile Glu Pro Leu				
305	310	315	320	30
Pro Lys Glu Val Lys Val Tyr Leu Leu Thr Thr Ser Ser Ala Pro Tyr				
	325	330	335	
Cys Met His His Ser Leu Val Glu Phe His Leu Lys Glu Leu Arg Asn				
	340	345	350	
Lys Asp Thr Asn Ile Glu Val Thr Phe Leu Ser Ser Asn Ile Thr Ser				
	355	360	365	
Ser Ser Lys Ile Thr Ile Pro Lys Gln Gln Arg Tyr Gly Lys Gly Ile				
	370	375	380	40

Val Ala Val Gly Cys Met Arg Thr Gly Ile Ile Phe Ile Pro Ala Thr
 130 135 140

atc ctg ttg aag gcc aaa gac att ctc tat cga cta cag ttg tct aaa 542
 Ile Leu Leu Lys Ala Lys Asp Ile Leu Tyr Arg Leu Gln Leu Ser Lys
 145 150 155

gcc aag ggc att gtg acc ata gat gcc ctt gcc tca gag gtg gac tcc 590
 Ala Lys Gly Ile Val Thr Ile Asp Ala Leu Ala Ser Glu Val Asp Ser
 160 165 170

ata gct tct cag tgc ccc tct ctg aaa acc aag ctc ctg gtg tct gat 638
 Ile Ala Ser Gln Cys Pro Ser Leu Lys Thr Lys Leu Leu Val Ser Asp
 175 180 185 190

cac agc cgt gaa ggg tgg ctg gac ttc cga tcg ctg gtt aaa tca gca 686
 His Ser Arg Glu Gly Trp Leu Asp Phe Arg Ser Leu Val Lys Ser Ala
 195 200 205

tcc cca gaa cac acc tgt gtt aag tca aag acc ttg gac cca atg gtc 734
 Ser Pro Glu His Thr Cys Val Lys Ser Lys Thr Leu Asp Pro Met Val
 210 215 220

atc ttc ttc acc agt ggg acc aca ggc ttc ccc aag atg gca aaa cac 782
 Ile Phe Phe Thr Ser Gly Thr Thr Gly Phe Pro Lys Met Ala Lys His
 225 230 235

tcc cat ggg ttg gcc tta caa ccc tcc ttc cca gga agt agg aaa tta 830
 Ser His Gly Leu Ala Leu Gln Pro Ser Phe Pro Gly Ser Arg Lys Leu

10

20

30

40

240	245	250		
cgg agc ctg aag aca tct gat gtc tcc tgg tgc ctg tcg gac tca gga	878			
Arg Ser Leu Lys Thr Ser Asp Val Ser Trp Cys Leu Ser Asp Ser Gly				
255	260	265	270	
tgg att gtg gct acc att tgg acc ctg gta gaa cca tgg aca gcg ggt	926			10
Trp Ile Val Ala Thr Ile Trp Thr Leu Val Glu Pro Trp Thr Ala Gly				
275	280	285		
igt aca gtc ttt atc cac cat ctg cca cag ttt gac acc aag gtc atc	974			
Cys Thr Val Phe Ile His His Leu Pro Gln Phe Asp Thr Lys Val Ile				
290	295	300		20
ata cag aca ttg ttg aaa tac ccc att aac cac ttt tgg ggg gta tca	1022			
Ile Gln Thr Leu Leu Lys Tyr Pro Ile Asn His Phe Trp Gly Val Ser				
305	310	315		
ict ata tat cga atg att ctg cag cag gat ttc acc agc atc agg ttc	1070			
Ser Ile Tyr Arg Met Ile Leu Gln Gln Asp Phe Thr Ser Ile Arg Phe				
320	325	330		30
cct gcc ctg gag cac tgc tat act ggc ggg gag gtc gtg ttg ccc aag	1118			
Pro Ala Leu Glu His Cys Tyr Thr Gly Gly Glu Val Val Leu Pro Lys				
335	340	345	350	
gat cag gag gag tgg aaa aga cgg acg ggc ctt ctg ctc tac gag aac	1166			
Asp Gln Glu Glu Trp Lys Arg Arg Thr Gly Leu Leu Leu Tyr Glu Asn				40
355	360	365		

tat ggg cag tcg gaa acg gga cta att tgt gcc acc tac tgg gga atg 1214
 Tyr Gly Gln Ser Glu Thr Gly Leu Ile Cys Ala Thr Tyr Trp Gly Met
 370 375 380

aag atc aag ccg ggt ttc atg ggg aag gcc act cca ccc tat gac gtc 1262
 Lys Ile Lys Pro Gly Phe Met Gly Lys Ala Thr Pro Pro Tyr Asp Val
 385 390 395

10

cag gtc att gat gac aag ggc agc atc ctg cca cct aac aca gaa gga 1310
 Gln Val Ile Asp Asp Lys Gly Ser Ile Leu Pro Pro Asn Thr Glu Gly
 400 405 410

aac att ggc atc aga atc aaa cct gtc agg cct gtg agc ctc ttc atg 1358
 Asn Ile Gly Ile Arg Ile Lys Pro Val Arg Pro Val Ser Leu Phe Met
 415 420 425 430

20

tgc tat gag ggt gac cca gag aag aca gct aaa gtg gaa tgt ggg gac 1406
 Cys Tyr Glu Gly Asp Pro Glu Lys Thr Ala Lys Val Glu Cys Gly Asp
 435 440 445

30

ttc tac aac act ggg gac aga gga aag atg gat gaa gag ggc tac att 1454
 Phe Tyr Asn Thr Gly Asp Arg Gly Lys Met Asp Glu Glu Gly Tyr Ile
 450 455 460

tgt ttc ctg ggg agg agt gat gac atc att aat gcc tct ggg tat cgc 1502
 Cys Phe Leu Gly Arg Ser Asp Asp Ile Ile Asn Ala Ser Gly Tyr Arg
 465 470 475

40

atc ggg cct gca gag gtt gaa agc gct ttg gtg gag cac cca gcg gtg 1550
 Ile Gly Pro Ala Glu Val Glu Ser Ala Leu Val Glu His Pro Ala Val
 480 485 490

gcg gag tca gcc gtg gtg ggc agc cca gac ccg att cga ggg gag gtg 1598
 Ala Glu Ser Ala Val Val Gly Ser Pro Asp Pro Ile Arg Gly Glu Val
 495 500 505 510

10

gtg aag gcc ttt att gtc ctg acc cca cag ttc ctg tcc cat gac aag 1646
 Val Lys Ala Phe Ile Val Leu Thr Pro Gln Phe Leu Ser His Asp Lys
 515 520 525

gat cag ctg acc aag gaa ctg cag cag cat gtc aag tca gtg aca gcc 1694
 Asp Gln Leu Thr Lys Glu Leu Gln Gln His Val Lys Ser Val Thr Ala
 530 535 540

20

cca tac aag tac cca agg aac gtg gag ttt gtc tca gag ctg cca aaa 1742
 Pro Tyr Lys Tyr Pro Arg Asn Val Glu Phe Val Ser Glu Leu Pro Lys
 545 550 555

acc atc act ggc aag att gaa cgg aag gaa ctt cgg aaa aag gag act 1790
 Thr Ile Thr Gly Lys Ile Glu Arg Lys Glu Leu Arg Lys Lys Glu Thr
 560 565 570

30

ggt cag atg taa tcggcagtga actcagaacg cactgcacac ctaaggcaaa 1842
 Gly Gln Met
 575

40

tccttggcca ctttagtctc ccactatgg tgaggacgag ggtggggcat tgagagtgtt 1902

gatttgggaa agtatcagga gtgccataat cactagttaa ttc

1945

<210> 10

<211> 577

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Met Gln Trp Leu Met Arg Phe Arg Thr Leu Trp Gly Ile His Lys Ser
1 5 10 15

Phe His Asn Ile His Pro Ala Pro Ser Gln Leu Arg Cys Arg Ser Leu
20 25 30

20

Ser Glu Phe Gly Ala Pro Arg Trp Asn Asp Tyr Glu Val Pro Glu Glu
35 40 45

Phe Asn Phe Ala Ser Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Ala Gln Lys Glu Lys
50 55 60

Glu Gly Lys Arg Gly Pro Asn Pro Ala Phe Trp Trp Val Asn Gly Gln
65 70 75 80

Gly Asp Glu Val Lys Trp Ser Phe Arg Glu Met Gly Asp Leu Thr Arg
85 90 95

30

Arg Val Ala Asn Val Phe Thr Gln Thr Cys Gly Leu Gln Gln Gly Asp
100 105 110

His Leu Ala Leu Met Leu Pro Arg Val Pro Glu Trp Trp Leu Val Ala
115 120 125

Val Gly Cys Met Arg Thr Gly Ile Ile Phe Ile Pro Ala Thr Ile Leu
130 135 140

40

Leu Lys Ala Lys Asp Ile Leu Tyr Arg Leu Gln Leu Ser Lys Ala Lys

Lys Pro Gly Phe Met Gly Lys Ala Thr Pro Pro Tyr Asp Val Gln Val
 385 390 395 400
 Ile Asp Asp Lys Gly Ser Ile Leu Pro Pro Asn Thr Glu Gly Asn Ile
 405 410 415
 Gly Ile Arg Ile Lys Pro Val Arg Pro Val Ser Leu Phe Met Cys Tyr
 420 425 430
 Glu Gly Asp Pro Glu Lys Thr Ala Lys Val Glu Cys Gly Asp Phe Tyr
 435 440 445
 Asn Thr Gly Asp Arg Gly Lys Met Asp Glu Glu Gly Tyr Ile Cys Phe
 450 455 460
 Leu Gly Arg Ser Asp Asp Ile Ile Asn Ala Ser Gly Tyr Arg Ile Gly
 465 470 475 480
 Pro Ala Glu Val Glu Ser Ala Leu Val Glu His Pro Ala Val Ala Glu
 485 490 495
 Ser Ala Val Val Gly Ser Pro Asp Pro Ile Arg Gly Glu Val Val Lys
 500 505 510
 Ala Phe Ile Val Leu Thr Pro Gln Phe Leu Ser His Asp Lys Asp Gln
 515 520 525
 Leu Thr Lys Glu Leu Gln Gln His Val Lys Ser Val Thr Ala Pro Tyr
 530 535 540
 Lys Tyr Pro Arg Asn Val Glu Phe Val Ser Glu Leu Pro Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Thr Gly Lys Ile Glu Arg Lys Glu Leu Arg Lys Lys Glu Thr Gly Gln
 565 570 575
 Met

10

20

30

40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sirRNA sense strand for TRPM4

<400> 11

gcacagcaau uuccuccggt t

21

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sirRNA antisense strand for TRPM4

<400> 12

ccggaggaaa uugcugugct t

21

40

<210> 13		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirNA		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:sirNA sense strand for PL1A1A		
<400> 13		20
agugcgcuga cuuccagagt t	21	
<210> 14		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirNA		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:sirNA antisense strand for PL1A1A		40

<400> 14

cucuggaagu cagcgacut t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sirRNA sense strand for BUCS1

20

<400> 15

gcuccuggug ucugaucact t

21

<210> 16

30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:siRNA antisense
strand for BUCS1

<400> 16

gugaucagac accaggagct t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:siRNA

10

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:siRNA sense
strand for luciferase

<400> 17

cguacgcgga auacuucgat t

21

30

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sirRNA antisense strand for luciferase

<400> 18

ucgaaguauu ccgcguacgt t

21

10

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:sirRNA

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sirRNA sense strand for Eg5

30

<400> 19

cuggaucgua agaaggcagt t

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:siRNA

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:siRNA antisense strand for Eg5

10

<400> 20

cugccuucuu acgauccagt t

21

<210> 21

20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR sense primer for TRPM4

30

<400> 21

ttctcgccct cttttgccct ccactc

26

<210> 22

<211> 30

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR
antisense primer for TRPM4

<400> 22

acaactatcca tgcctaaactc tagctcctcc

30

10

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR sense
primer for PLA1

<400> 23

accccacaat gccagataaa ccaag

25

30

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR
antisense primer for PLA1

<400> 24

ttcaggtcac aggaaacagt cacac

25

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR sense
primer for BUCS1

<400> 25

acaaatcctt ccacaacatc c

21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: RT-PCR
antisense primer for BUCS1

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: siRNA

<400> 26

ccattcaccc accaaaaagc

20

【0189】

【発明の効果】

本発明により、前立腺癌で特異的に発現している、TRPM4、PLA1A及びBUCS1を見出し、該遺伝子が癌細胞の発生及び/または増殖に関連する遺伝子であることを見出し、該癌遺伝子を用いた前立腺癌の検出方法、前立腺癌治療及び/または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法、及び癌治療及び/または予防用医薬組成物を提供することができた。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 TRPM4の前立腺正常組織と腫瘍組織における発現量を示す図。

【図2】 TRPM4の各臓器(正常組織)ごとの発現量を示す図。

【図3】 PLA1Aの前立腺正常組織と腫瘍組織における発現量を示す図。

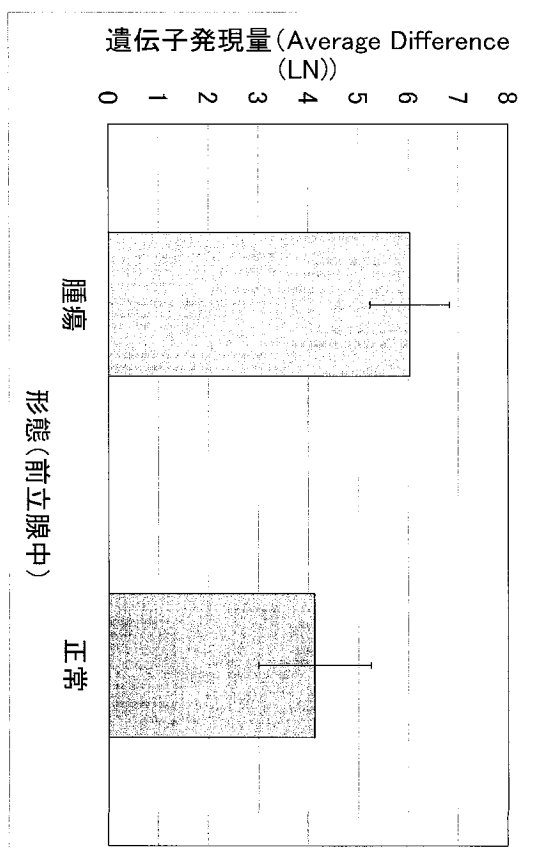
【図4】 PLA1Aの各臓器(正常組織)ごとの発現量を示す図。

20

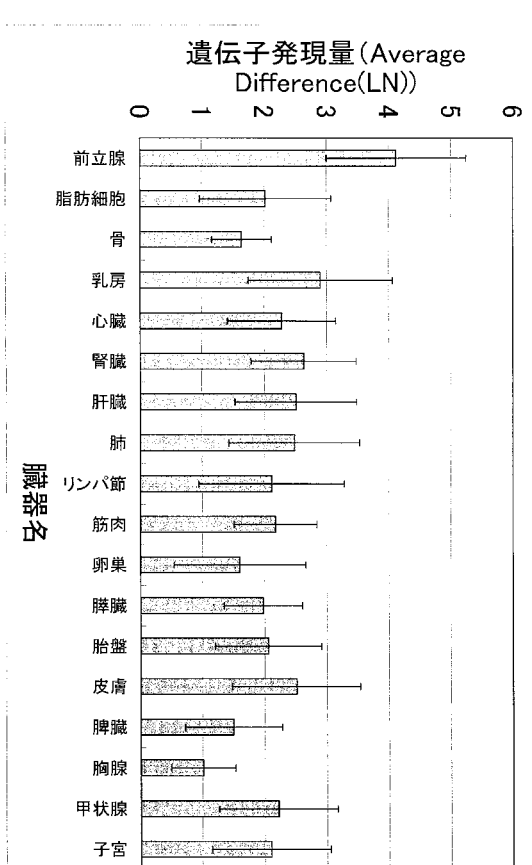
【図5】 BUCS1の前立腺正常組織と腫瘍組織における発現量を示す図。

【図6】 BUCS1の各臓器(正常組織)ごとの発現量を示す図。

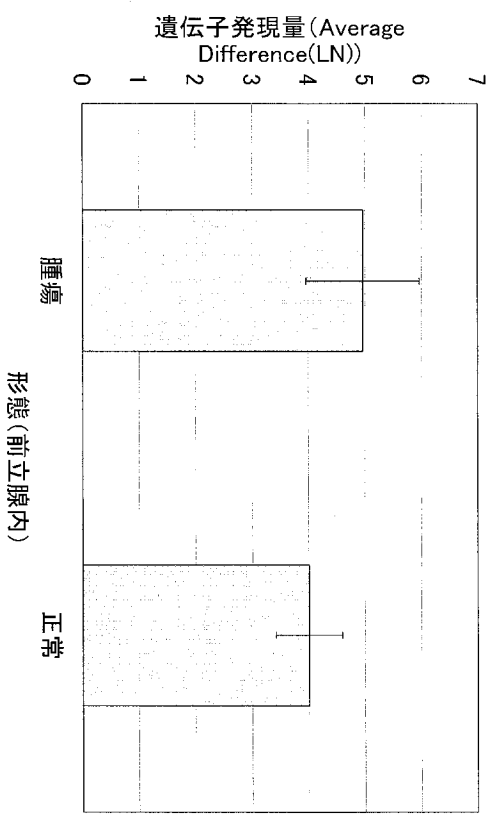
【図1】



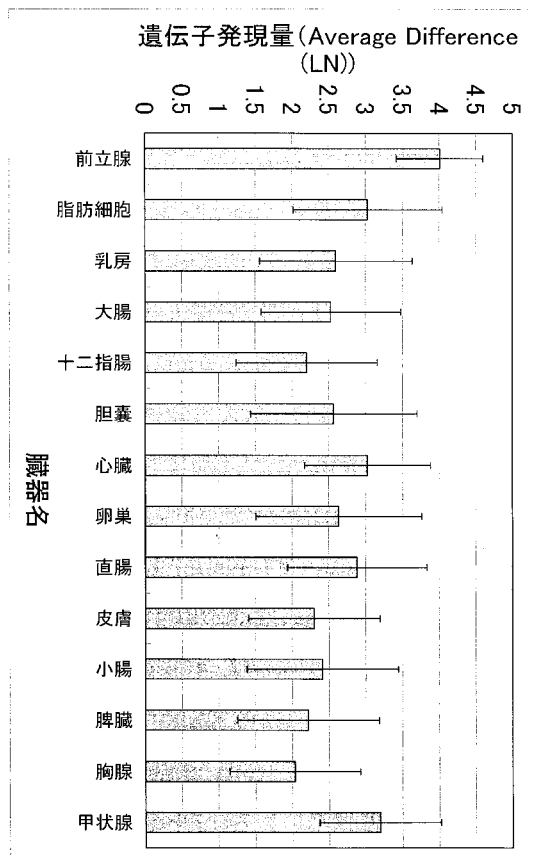
【図2】



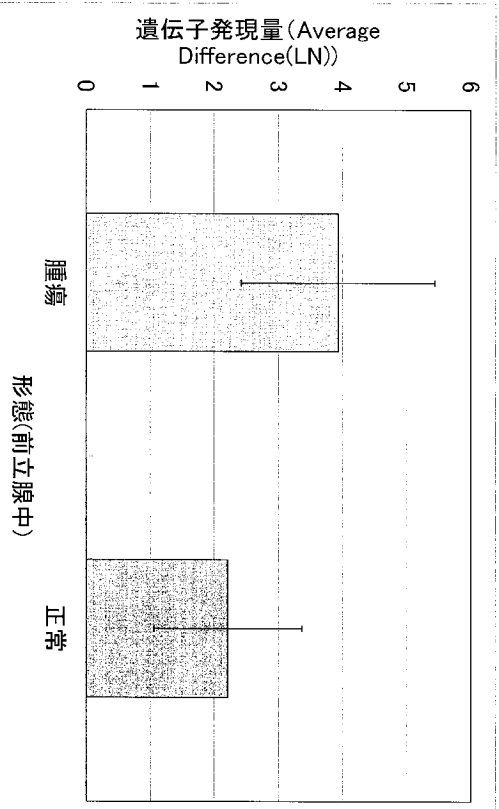
【 図 3 】



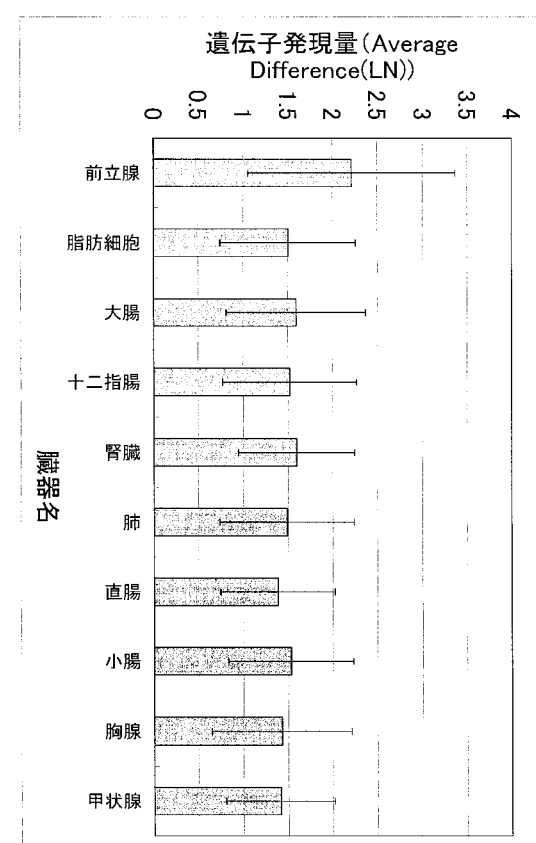
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	A
	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	F

(72)発明者 我妻 利紀

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(72)発明者 平井 岳大

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA12 BA07 BA11 BA80 CA04 CA09 HA14 HA15
 4B063 QA19 QQ02 QQ09 QQ42 QQ52 QQ79 QR56 QR59 QR62 QR77
 QR80 QS24 QS25 QS28 QS34 QX01
 4C084 AA13 ZB262
 4C085 AA14 BB01 DD63
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 ZB26

专利名称(译)	致癌基因及其用途		
公开(公告)号	JP2004267118A	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2003063578	申请日	2003-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	福地圭介 我妻利紀 平井岳大		
发明人	福地 圭介 我妻 利紀 平井 岳大		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.T A61K48/00 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/574.A C12N15/00.A C12N15/00.F C12N15/09.200 C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA07 4B024/BA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ09 4B063 /QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/ZB262 4C085 /AA14 4C085/BB01 4C085/DD63 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZB26		
代理人(译)	矢口俊明		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：寻找与前列腺癌细胞的发展和/或增殖有关的基因，使用癌基因检测前列腺癌，筛选具有前列腺癌治疗和/或预防作用的化合物，以及治疗前列腺癌。和/或提供一种预防性药物组合物。解决方案：一种以TMPM4，PLA1A和/或BUCS1的表达水平为指标的前列腺癌检测方法，一种用于该检测方法的前列腺癌检测试剂盒以及一种具有新型前列腺癌治疗和/或预防作用的化合物的筛选方法。以及用于治疗 and/或预防前列腺癌的药物组合物。[选择图]无。

標的遺伝子名	PC-3	SD.	遺伝子発現量
LUC	100% ± 3%		100%
Eg5	31% ± 2%		N.D.
TRPM4	71% ± 10%		67%
PLA1A	74% ± 8%		51%
BUCS1	85% ± 10%		0%